



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

**“Caracterización molecular y germinación simbiótica de hongos endófitos de raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que se desarrollan en *Hedyosmum cumbalense*.”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Autor:

Miguel Ángel Castro Cornejo

Cl: 0104051727

Directora:

Blga. Denisse Fabiola Peña Mogrovejo, Msc

Cl: 0102501889

**Cuenca, Ecuador**

07/11/2019

## RESUMEN

La relación simbiótica existente entre los microorganismos endófitos y las orquídeas, otorga beneficios para la germinación de las semillas. *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay son especies de orquídeas epífitas pertenecientes a los bosques Andinos del Ecuador, han sido poco estudiadas, por lo que no hay información disponible sobre su cuidado y conservación, esta situación es preocupante, por la progresiva pérdida en la diversidad florística en el Ecuador. En el presente estudio se aislaron e identificaron molecularmente hongos endófitos cultivables presentes en las raíces de las orquídeas en estudio, para ello, se usaron métodos de aislamiento de hongos endófitos y la identificación molecular se realizó mediante secuenciación de la región ITS1 - ITS4 amplificada por PCR. Los productos obtenidos fueron analizados por BLAST en base a las secuencias obtenidas del NCBI. Además, se determinó la composición e índice de diversidad de las comunidades de hongos endófitos que colonizan las raíces de orquídeas epífitas mediante la separación electroforética de los amplicones generados, de la región ITS1 e ITS4, en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE). Finalmente se evaluó el efecto fito-estimulante de los hongos endófitos cultivables aislados, en la germinación simbiótica de semillas de las mismas especies de orquídeas. Los resultados de la secuenciación mostraron que los hongos aislados pertenecen a los siguientes grupos taxonómicos: *Ascomycota*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Debaryomyces*, *Zygomycete*, *fungal* y *fungal endophyte*. En cambio, la diversidad de las comunidades de hongos endófitos encontrada fue baja, en ambas especies en estudio. El ensayo de germinación simbiótica en *Elleanthus amethystiniodes* y *Cyrtochillum gyriferum* no evidenció efecto estimulante en ninguno de los aislados fúngicos, siendo significativamente superior el control positivo en medio Phytamax e incluso el control negativo en medio avena agar.

## PALABRAS CLAVE

Hongos endófitos. Diversidad hongos endófitos. DGGE. PCR.

## ABSTRACT

The symbiotic relation between endophyte microorganisms and orchids provides benefits for seed germination. *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay are species of epiphytic orchids belonging to the Andean forests of Ecuador and have been little studied, so there is no information available on their care and conservation. This situation is worrying about the progressive loss of floristic diversity in Ecuador. In the present study, the molecules of the cultivable endophytic fungi present in the roots of the orchids were isolated and identified. For this, endophytic fungus isolation methods were used. Molecular identification was enhanced by sequencing of the ITS1-ITS4 region amplified by PCR. The products obtained were analyzed by BLAST based on the sequences obtained from the NCBI. In addition, the composition and index of the diversity of the endophytic fungal communities that colonize the roots of epiphytic orchids was determined by electrophoretic separation of the amplicons generated from the ITS1 and ITS4 region in polyacrylamide gels with denaturing gradient (DGGE). Finally, the phyto-stimulating effect of isolated cultivable endophytic fungi in the symbolic germination of seeds of the same orchid species was evaluated. The sequencing results showed that isolated fungi belong to the taxonomic groups: *Ascomycota*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Debaryomyces*, *Zygomycete*, *funga* and *funga endophyte*. In contrast, the diversity of the endophytic fungal communities found was low in both study species. The symbiotic germination test in *Elleanthus amethystiniodes* and *Cyrtochillum gyriferum* showed no stimulating effect in any of the fungal isolates, the positive control in Phytamax medium and even the negative control in oatmeal being significantly higher.

## Keywords

Endophyted fungus, Diversity Endophyted fungus. DGGE. PCR.



## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE IMAGENES .....	12
INDICE DE ANEXOS .....	14
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA .....	16
DERECHOS DE AUTOR .....	17
AGRADECIMIENTOS .....	18
DEDICATORIA .....	19
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	20
2. OBJETIVO.....	23
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
CAPITULO III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Diversidad florística del Ecuador.....	24
3.1.1 Generalidades.....	24
3.1.2 Interacciones ecológicas con orquídeas epífitas.....	25



3.2 Especies en Estudio .....	26
3.2.1 <i>Hedyosmum cumbalense</i> H.Karst.....	26
3.2.2 <i>Cyrtochillum gyriferum</i> .....	27
3.2.3 <i>Elleanthus amethystiniodes</i> Garay .....	27
3.3 Hongos Endófitos .....	28
3.4 Hongos micorrízicos.....	28
3.5 Interacción con hongos que forman micorrizas.....	30
3.6 Influencia del forófito en las especies epífitas hospederas.....	31
3.7 Análisis de las comunidades fúngicas.....	33
3.8 Importancia de la biotecnología en la germinación de semillas de orquídeas .....	36
3.9 Propagación de orquídeas a partir de semillas .....	37
3.9.1 Germinación de las semillas de orquídeas epífitas, germinación simbiótica y no simbiótica.....	38
CAPITULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
4.1 Área de Estudio .....	41
4.2 Área de ejecución del proyecto.....	43
4.3 Colecta, conservación de las muestras de raíces.....	43
4.4 Medios de Cultivos.....	44
4.4.1 Medio FMI (Fungi Isolation Medium).....	44
4.4.2 Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa).....	45
4.4.3 Medio OMA (Agar avena).....	45



4.4.4 Medio Phytamax.....	45
4.5 Metodología para la consecución del objetivo 1.....	45
4.5.1 Aislamiento de los hongos Endófitos.....	46
4.6.1 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenómico de raíces de <i>Cyrtoschillium gyriferum</i> y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> total de las cepas de hongos cultivadas.....	46
4.6.2 Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante la reacción de PCR convencional.....	47
4.6.3 Análisis de los productos obtenidos por PCR y los resultados de la electroforesis en gel de agarosa.....	48
4.7 Metodología para la consecución del objetivo 2.....	48
4.7.1 Desinfección de las muestras de raíces colectadas.....	48
4.7.2 Extracción del ADN metagenómico de las muestras de raíces colectadas.....	49
4.7.3 Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante la reacción de PCR convencional.....	49
4.7.4 Análisis de los productos obtenidos por PCR y los resultados de la electroforesis en gel de agarosa.....	50
4.7.5 Anidación de primers y verificación de resultados por electorforesis en gel de agarosa.....	50



4.7.6 Separación y fotodocumentación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).....	51
4.7.7 Análisis de los resultados de la electroforesis de los productos obtenidos por DGGE.....	52
4.8 Metodología para la consecución del objetivo 3.....	53
4.8.1 Preparación de medios de cultivos.....	53
4.8.2 Desinfección y prueba de viabilidad de las semillas de ambas especies de orquídeas epífitas.....	53
4.8.3 Inoculación de las cepas puras de hongos previamente aisladas.....	54
4.8.4 Análisis, evaluación del porcentaje de germinación de semillas y toma de datos de los procesos germinativos.....	55
4.9 Análisis estadístico.....	56
CAPITULO V: RESULTADOS .....	57
5.1 Extracción del ADN de las cepas de hongos cultivados.....	57
5.1.2 Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante la reacción PCR de las muestras extraídas.....	57
5.1.3 Análisis de los productos obtenidos por PCR y los resultados obtenidos por secuenciación en Macrogen.....	58
5.2 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenómico total de las muestras de raíces colectadas.....	60



5.2.1 Amplificación (PCR) de marcadores moleculares fúngicos en muestras de raíz.....	61
5.2.2 Segunda amplificación (PCR) con anidación y grapas en muestras de raíz.....	61
5.2.3 Separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).....	62
5.2.4 Análisis de riqueza de las comunidades de hongos endófitos presentes en cada muestra amplificada.....	64
5.3 Viabilidad de las semillas de orquídeas de <i>Cyrtochillum gyriferum</i> y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> .....	66
5.3.1 Ensayo de germinación simbiótica.....	66
5.3.2 Germinación simbiótica de semillas orquídeas.....	67
5.3.3 Porcentaje de germinación de las dos especies de orquídeas en sus tres estadios de desarrollo luego de 75 días de inoculación con hongos endófitos.....	70
CAPITULO V: DISCUSIÓN .....	72
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	74
RECOMENDACIONES.....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	76
ANEXOS .....	90



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos generales de la ubicación de los bosques donde se recolectaron las muestras.....	41
<b>Tabla 2.</b> Datos generales del número de muestras colectadas en las diferentes localidades.....	44
<b>Tabla 3.</b> Identificación taxonómica de los hongos aislados secuenciados por BLAST.. .....	59
<b>Tabla 4.</b> Valores de índice de diversidad e índice de riqueza de las comunidades de hongos endófitos presentes en la raíz de orquídea de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> muestra 30. A partir de la amplificación por el proceso de DGGE.....	65
<b>Tabla 5.</b> Valores de índice de diversidad e índice de riqueza de las comunidades de hongos endófitos presentes en la raíz de orquídea de <i>Cyrtochillum gyriferum</i> muestra 7. A partir de la amplificación por el proceso de DGGE.....	65
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de Germinación durante los tres primeros estadios de desarrollo de las semillas (promedios con errores estándar) de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> y <i>Cyrtochillum gyriferum</i> inoculadas con las diferentes cepas de hongos endófitos, luego de 75 días de su inoculación.....	71
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de viabilidad de semillas.....	104
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la prueba Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ) para las variables no paramétricas de las semillas de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.....	112
<b>Tabla 9.</b> Resultados de análisis de varianza de la prueba de bondad de Test de tukey ( $p < 0.05$ ) comparación de medias para las variables no paramétricas de las semillas de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.....	112
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la prueba Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ) para las variables no paramétricas de las semillas de <i>Cyrtochillum Gyriferum</i> en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.....	112
<b>Tabla 11.</b> Resultados de análisis de varianza de la prueba de bondad de Test de tukey ( $p < 0.05$ ) comparación de medias para las variables no paramétricas de las semillas de <i>Cyrtochillum Gyriferum</i> en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de un corte transversal de una raíz de orquídea y la simbiosis micorrízica.....	29
<b>Figura 2.</b> Pasos para el análisis de comunidades de microorganismos por el método de PCR-DGGE.....	36
<b>Figura 3.</b> Estados de desarrollo de los procesos germinativos por Mitchell 1989: Ciclo de vida de orquídea epífita.....	39
<b>Figura 4.</b> Mapa de ubicación política donde se extrajeron las muestras para el proyecto.....	42
<b>Figura 5.</b> Mapa de ubicación donde se extrajeron las muestras para el proyecto.....	42
<b>Figura 6.</b> Mapa de ubicación donde se realizará el proyecto.....	43
<b>Figura 7.</b> Promedio de la Germinación simbiótica de las semillas de <i>Elleanthus amathistiniodes</i> .....	68
<b>Figura 8.</b> Promedio de la Germinación simbiótica de las semillas de <i>Cyrtorchillum gryferum</i> .....	69
<b>Figura 9.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo1.....	95
<b>Figura 10.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 1 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada.....	96
<b>Figura 11.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 3 y hongo 3(1). ....	96
<b>Figura 12.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 3 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. ....	97
<b>Figura 13.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 3 (1) por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. ....	97

<b>Figura 14.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 8.....	98
<b>Figura 15.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 8 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada .....	98
<b>Figura 16.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 9.....	99
<b>Figura 17.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 9 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. ....	99
<b>Figura 18.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 10.....	100
<b>Figura 19.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 10 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. ....	100
<b>Figura 20.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 11.....	101
<b>Figura 21.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 11 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. ....	101
<b>Figura 22.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 14.....	102
<b>Figura 23.</b> Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 14 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. ....	102
<b>Figura 24.</b> Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 19.....	103



**Figura 25.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 19 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada ..... 103

**Figura 26:** Diseño o esquema de laboratorio: Especies de semilla de orquídeas para cada tratamiento por repetición.....111

## ÍNDICE DE IMAGENES

<b>Imagen 1.</b> Electroforesis en gel de Agarosa (1% p/v) producto de la extracción de ADN metagenómico de las muestras de hongos de dos especies de orquídeas: <i>Cyrtochillum gyriferum</i> Hongos (1; 3(1); 3(2); 8; 9; 10; 11; 14) y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> Hongo 19. Control positivo (C+) y Negativo (C-).	57
<b>Imagen 2.</b> Amplificación por PCR de las regiones ITS 1 e ITS4 por medio de primers universales para hongos sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v. <i>Cyrtochillum gyriferum</i> Hongos (1;3(1);3(2);8;9;10;11;14) y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> Hongo19. Control positivo (C+) y Negativo (C-).	58
<b>Imagen 3.</b> Electroforesis en el gel de agarosa al 1% p/v producto de la extracción de ADN metagenómico de las muestras de raíces de orquídeas. <i>Cyrtochillum gyriferum</i> raíces (2, 7, 10, 13, 15, 29, 31, 32, 33) y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> raíces (30, 28, 34).	60
<b>Imagen 4.</b> Amplificación por PCR en gel de agarosa al 1% p/v producto de la extracción de ADN metagenómico de las muestras de raíces de orquídeas. <i>Cyrtochillum gyriferum</i> raíces 7(1), 7(2), 7(3) y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> raíces (30(1), 30(2), 30(*), 30(x), 34(1), 34 (2). Control positivo (C+); Control negativo (C-).	61
<b>Imagen 5.</b> Amplificación por PCR anidada usando, primers ITS1 e ITS4 (con grapa) en gel de agarosa al 1% p/v a partir del producto de amplificación del ADN metagenómico de muestras de raíces de orquídeas. <i>Cyrtochillum gyriferum</i> raíces 7(1) y <i>Elleanthus amethystiniodes</i> raíces 30(2), 34(1). Control positivo (C+); Control negativo (C-).	62
<b>Imagen 6.</b> Perfil de DGGE CON RANGO de 20%-35% para ITSGC (con grapa) ITS4 en comunidades de hongos endófitos presentes en raíces de orquídeas, en las especies de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> (muestra 30) y <i>Cyrtochillum gyriferum</i> (muestra 7) ...	64
<b>Imagen 7.</b> Morfología de colonias de los nueve hongos aislados con anterioridad que fueron inoculados con semillas de ambas especies de orquídeas de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> y <i>Cyrtochillum gyriferum</i> .	67
<b>Imagen 8.</b> Germinación simbiótica de semillas de <i>Elleanthus amethystiniodes</i> y desarrollo de los estados germinativos de 0 a 75 días después de la germinación (DAG). a) Semillas en estado original (0DAG), b). Estadio 0 (semillas hidratadas (15-30DAG), c) Ruptura de la testa y aparición de rizoides (45-60) DAG, d) aparición de rizoides (75DAG), en presencia del tratamiento Phytamax.	68
<b>Imagen 9.</b> Germinación simbiótica de semillas de <i>Cyrtochillum Gyriferum</i> y desarrollo de los estados germinativos de 0 a 75 días después de la germinación (DAG) a) y a1) semillas en estado original (0-15 DAG), b). Estadio 0 (semillas hidratadas) (15-30 DAG), c) Ruptura de la testa (30-45DAG), d) aparición de rizoides (45-60 DAG), d1) aparición de rizoides (60-75 DAG), en presencia del tratamiento Phytamax.	70

<b>Imagen10.</b> Desinfección de raíces de orquídeas recolectadas siguiendo el protocolo establecido.....	91
<b>Imagen11.</b> Desinfección de raíces de orquídeas recolectadas siguiendo el protocolo establecido.....	92
<b>Imagen 12.</b> Siembra de raíces de orquídeas en Medio FMI para la obtención de hongos endófitos siguiendo el protocolo establecido en laboratorio.....	92
<b>Imagen 13.</b> Hongos obtenidos del aislamiento de las raíces de orquídeas de las especies <i>Elleanthus amethystinoides</i> y <i>Cyrtocillium Gyriferum</i> sembradas en Medio FMI siguiendo el protocolo establecido en laboratorio.....	93
<b>Imagen 14.</b> Hongos obtenidos del aislamiento de las raíces de orquídeas de las especies <i>Elleanthus amethystinoides</i> y <i>Cyrtocillium Gyriferum</i> sembradas en Medio FMI siguiendo el protocolo establecido en laboratorio.....	93
<b>Imagen 15.</b> Extracción de ADN de las muestras de hongos aislados de las raíces de orquídeas siguiendo el protocolo establecido.....	94
<b>Imagen 16.</b> Protocolo de extracción de ADN.....	94
<b>Imagen 17.</b> Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante reacción PCR.....	95
<b>Imagen 18.</b> Protocolo para la viabilidad de semillas de orquídeas.....	104
<b>Imagen 19.</b> Protocolo de extracción de ADN meta genómica de las raíces de orquídeas.....	105
<b>Imagen 20.</b> Proceso PCR de las muestras de orquídeas. ....	106
<b>Imagen 21.</b> Proceso de migración de gel y electroforesis de las muestras de hongos y raíces .....	107
<b>Imagen 22.</b> Proceso DGGE de las muestras de raíces .....	108
<b>Imagen 23.</b> Siembra de semillas de orquídeas con sus respectivos tratamientos.....	110
<b>Imagen 24.</b> Análisis de los procesos germinativos cada 15 días después de su siembra. ....	111

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Recolección de raíces y semillas de orquídeas de las especies de <i>Elleanthus amethystinoides</i> y <i>Cyrtochillum Gryferum</i> en los bosques de Lluchicarrumi (Gañadel) y Campanarumi (Gañadel).....	90
<b>Anexo 2.</b> Desinfección de raíces de orquídeas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> y <i>Cyrtochillum Gryferum</i> .....	91
<b>Anexo 3.</b> Aislamiento de los hongos Endófitos de las raíces de orquídeas colectadas.....	92
<b>Anexo 4.</b> Extracción de ADN metagenómica de las muestras de hongos.....	94
<b>Anexo 5.</b> PCR de las muestras fúngicas.....	95
<b>Anexo 6.</b> Secuencias.....	95
<b>Anexo 7.</b> Viabilidad de las semillas.....	104
<b>Anexo 8.</b> Extracción ADN raíces de orquídeas.....	105
<b>Anexo 9.</b> Proceso PCR de las muestras de raíces de orquídeas.....	106
<b>Anexo 10.</b> Proceso de migración de gel y electroforesis de las muestras de hongos y raíces.....	107
<b>Anexo 11.</b> Proceso DGGE de las muestras de raíces amplificadas.....	108
<b>Anexo 12.</b> Proceso de germinación simbiótica de las semillas de orquídeas con sus respectivos hongos.....	110



<b>Anexo 13.</b> Diagrama de trabajo de laboratorio para la inoculación de los hongos aislados.....	111
<b>Anexo 14.</b> Tablas estadísticas.....	112




## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Miguel Angel Castro Cornejo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Caracterización molecular y germinación simbiótica de hongos endófitos de raíces de *Cyrtocillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que se desarrollan en *Hedyosmum cumbalense*.*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 07/11/2019



Miguel Ángel Castro Cornejo

C.I: 0104051727

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Miguel Ángel Castro Cornejo, autor del trabajo de titulación "Caracterización molecular y germinación simbiótica de hongos endófitos de raíces de *Cyrtocillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que se desarrollan en *Hedyosmum cumbalense*.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 07/11/2019



Miguel Ángel Castro Cornejo

C.I: 0104051727



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa

**DGGE:** Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante

**ms.n.m:** metros sobre el nivel del mar

**UTOs:** Unidades Taxonómicas Operacionales

**FIM:** fungy isolation médium

**PDA:** Agar Papa Dextrosa

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information



## **DERECHOS DE AUTOR**

El autor del presente trabajo y la Universidad de Cuenca, otorgan el permiso de usar esta tesis para fines de consulta y como referencia científico-técnica de apoyo.

Cualquier otro uso estará sometido a las Leyes de Propiedad Intelectual Vigentes. Otro tipo de permisos para usar el material de este documento, deberán ser obtenidos del autor expresamente.

Cuenca, a 18, Septiembre, 2019.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco, a mi familia por brindarme el apoyo cada día en mi vida. Y en especial a mis padres por tenerme paciencia y amor durante mi proceso de formación.

Mis agradecimientos especiales a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, por abrirme las puertas en la enseñanza profesional. Al igual agradecimiento a todos que conforman el departamento Laboratorio de Biología molecular, en especial a mi directora Bióloga Denisse Peña, por enseñarme, guiarme y tenerme paciencia en este proceso desarrollo de tesis y ser una gran docente y persona en todo este proceso de desarrollo estudiantil. Al igual de Dr. Eduardo Chica, Dr. Antonio Vallecillo y Dr. Andrés Yarzabal por brindarme sus conocimientos necesarios para la realización de este proyecto.

Y por último agradezco a todos los docentes de la Universidad de Cuenca por brindarnos todos sus conocimientos y apoyos para la formación como profesionales.

Miguel Ángel Castro Cornejo.



## DEDICATORIA

Dedicó este proyecto de tesis a mis padres Rubén y Eulalia.

A mi papá por darme enseñanzas de vida y apoyarme en mi vida. A mi mamá por estar al igual a mi lado y apoyarme en todo. Ambos por otorgarme su amor y fortaleza para salir adelante cada día

A mis hermanos Rubén y Fernando por darme su apoyo y estar a mi lado en toda la formación de mis estudios.

Miguel Ángel Castro Cornejo.

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son un grupo importante por su gran diversidad y belleza en Ecuador existen alrededor de 4000 especies y 40 % de endemismo (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). Forman parte de nuestro patrimonio natural, son apreciadas principalmente por su belleza y gran diversidad de formas, tamaños y colores, siendo estos mismos atributos los que han llevado a algunas especies a estar en categorías de conservación no favorables.

La pérdida de hábitats, la extracción de plantas en campo y dificultades propias de su fisiología han hecho que algunas especies se encuentren en ciertas categorías de amenaza. Valencia, Pitman, León-Yáñez, & Jorgensen (2000), reporta 35 especies en peligro crítico, 132 en peligro y 920 se consideran vulnerables. Según la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza el 74 % de las especies de orquídeas son vulnerables y el 11% están en peligro o peligro crítico.

Los bosques montanos del sur del Ecuador albergan especies de orquídeas poco estudiadas en cuanto a la diversidad de microorganismos con los que interactúan, pese a que éstas asociaciones son fundamentales en su ciclo de vida, pues, es bien conocido que las orquídeas en la naturaleza establecen relaciones simbióticas con hongos que favorecen su germinación y desarrollo (Abdelnour & Vega, 2013). La asociación de hongos micorrízicos y bacterias con orquídeas favorecen la germinación de semillas por medio de mecanismos de digestión de la materia orgánica de los sustratos, transferencia de carbohidratos al embrión y síntesis de fitohormonas (ácido indolacético, AIA) (Tsavkelova et al., 2007).

Pese a que el cultivo *in vitro* es una muy buena estrategia de propagación, en la mayoría de los casos, las plantas se propagan con fines comerciales y poco o nada se reintroduce en la naturaleza, además muchas mueren durante la fase de adaptación a condiciones *ex vitro*.

El conocimiento sobre el aporte de los hongos micorrícicos, es de suma importancia ya que se conoce que éstos suministran los nutrientes necesarios para la alimentación de las plantas y consecuentemente aportan en la conservación de la biodiversidad y en el mantenimiento y regulación de las fuentes de recursos transferidos al ecosistema (Barriuso, Santafé, Solis, & Sánchez, 2015). El desconocimiento y la falta de información disponible sobre estos microorganismos y sus relaciones son una limitante para la propagación y conservación de especies catalogadas como amenazadas o en categorías de riesgo.

*Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay son especies de orquídeas epífitas pertenecientes a los bosques Andinos del Ecuador, han sido poco estudiadas, por lo que no hay información disponible sobre su cuidado, propagación y conservación, esta situación es preocupante, ya que la progresiva pérdida en la diversidad florística en el Ecuador, sumada a la falta de información podrían llevar a estas especies a categorías críticas de conservación.

Estas especies de orquídeas, al ser epífitas, se desarrollan sobre diferentes hospederos, conocidos también como forófitos, entre ellos encontramos a *Hedyosmum cumbalense*, un árbol de bosque andino del Ecuador, catalogado como especie en peligro, debido a la tala indiscriminada para la producción de carbón (Valencia, Pitman, León-Yáñez, & Jorgensen, 2000).

La relación simbiótica existente entre los microorganismos endófitos y las orquídeas, otorga beneficios para la germinación de las semillas y el establecimiento de las orquídeas en su hábitat natural. (Wilkinson, Dixon, & Sivasithamparam, 1989) (D. W. Dearnarley, 2007) (Tsavkelova et al., 2007) (Galdiano, Pedrinho, Castellane, & Lemos, 2011) (Faria, Dias, Melo, & Carvalho costa, 2013). Es importante entonces, contar con conocimientos básicos sobre algunas de las relaciones que establecen las orquídeas con los microorganismos de su entorno, ya que esto permitiría llenar ese vacío de conocimiento que hoy en día existe sobre la asociación inter-



específica entre los biotipos hospederos, orquídeas epífitas y microorganismos fito-estimulantes en los bosques andinos primarios y secundarios de la provincia del Azuay; y con ello, establecer nuevas investigaciones que a futuro permitan desarrollar estrategias de conservación y por qué no, también de aprovechamiento de estos recursos.

Entonces se propone, caracterizar molecularmente las comunidades de hongos endófitos que colonizan las raíces de las orquídeas *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que se desarrollan sobre el mismo hospedero (*Hedyosmum cumbalense*) y la evaluación de su germinación simbiótica con hongos cultivables aislados de ellas.

Se espera que los resultados de esta investigación sean útiles para investigadores agrónomos, biólogos, botánicos, microbiólogos, ecólogos, entre otros, dedicados al estudio de orquídeas, microorganismos y las relaciones interespecíficas entre éstos y el forófito en el que se desarrollan. Instituciones públicas y privadas dedicadas a la conservación de estas especies podrían hacer uso de la información generada para mejorar los sistemas de regeneración natural; también productores y comerciantes podrían mejorar los sistemas de propagación haciendo uso de microorganismos fito-estimulantes, en caso de que estos puedan ser identificados y cultivados.

La información generada también aportará a las zonas de Lluchicarrumi (Gañadel), Llaviuco y Campanarumi (Gañadel) sitios de los cuales se extrajeron las muestras, aportando con conocimiento para la conservación de la diversidad y el ecosistema en ambos sectores. Comunidades, comerciantes y personas interesadas en la investigación y conservación de estas especies podrían despertar su interés en estas zonas y aportar para el manejo y aprovechamiento de orquídeas potenciándose nuevas investigaciones. En definitiva, el conocimiento abre puertas a nuevas oportunidades.

## 2. OBJETIVO.

### 2.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar molecularmente comunidades de hongos endófitos que colonizan raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que se desarrollan sobre *Hedyosmum cumbalense*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar e identificar molecularmente hongos cultivables, asociadas a las raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que crecen sobre *Hedyosmum cumbalense*.
- Determinar la composición y los índices de diversidad de las comunidades de hongos que colonizan las raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay en el forófito *Hedyosmum cumbalense*.
- Evaluar el efecto fitoestimulantes de por lo menos 2 hongos asociados a raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que se desarrollan en *Hedyosmum cumbalense* sobre la germinación de sus semillas y el desarrollo de plántulas.

## CAPITULO III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 DIVERSIDAD FLORISTICA DEL ECUADOR

#### 3.1.1 GENERALIDADES

La diversidad ecológica y eco-sistémica existente en el Ecuador, favorece a la diversidad de orquídeas (Orchidaceae), llegando a superar en números a diferentes países como Colombia, Brasil y Perú, registrándose en el Ecuador 4200 especies de orquídeas conocidas (Megadiverso, 2011). Endara, Williams, & León-Yanés,(2010), reportan 1707 especies de orquídeas endémicas en el Ecuador, entre éstas, *Lepanthes*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Epidendrum* y *Masdevallia* destacan por ser las más numerosas, estos datos han llevado a Ecuador al primer puesto en el ranking mundial de orquídeas (Kleinsy, Talyor, & Watson, 2011). No obstante, la deforestación en las regiones Andinas del Ecuador trae consigo la pérdida de hasta 20 mil hectáreas de bosques naturales, originando la reducción de la biodiversidad (Galeas et al., 2010). además, la expansión de la frontera agrícola y la pérdida de hábitats han contribuido también a esta situación (Jadán et al., 2016).

Según Jiménez, (2014); la alta tasa de deforestación, los incendios forestales, la minería anti técnica, la actividad petrolera, la apertura de carreteras y recolección de orquídeas tanto a nivel de bosques Andinos y páramos, ocasionan que las especies de orquídeas epifitas sean vulnerables en sus localidades de origen, favoreciendo a la pérdida de la diversidad florística (Gradstein, 2008). Parte de la problemática radica en la falta de conocimiento sobre estas especies vulnerables y pocos estudios acerca de los microorganismos asociados, que son beneficiosos para el crecimiento y desarrollo de las orquídeas. Estudios realizados no aportan en un gran porcentaje en la identificación de cepas aisladas de microorganismos, por otra parte, las técnicas tradicionales de cultivo permiten identificar solo el 1% de las especies que colonizan

ambientes naturales (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Por ello, se han desarrollado nuevas técnicas, basadas en métodos moleculares, que permiten un mayor acercamiento en el estudio de la composición, identificación y análisis de la diversidad de los microorganismos tanto a nivel de bacterias como fúngico (Rastogi & Sani, 2011). Las técnicas modernas aplicadas se basan en la extracción y el análisis del ADN del organismo en estudio.

Las orquídeas son plantas delicadas al momento de propagarse ya que solo el 2 o 3% del total de sus semillas son óptimas para que germinen en estado natural (Lauran, Thien, Khien, & Nhut, 2006). La adición de hongos micorrízicos de origen natural aumenta el porcentaje de germinación de las semillas (S. Smith & Read, 2010).

### **3.1.2 INTERACCIONES ECOLÓGICAS CON ORQUÍDEAS EPIFITAS**

La familia Orchidaceae y sus especies necesitan de hongos micorrízicos para su germinación por lo que se las denomina como mico-heterótrofas (Guzmán Salinas & Moreno Coronado, 2014). Los tejidos, raíces y rizomas de las especies de la familia Orchidaceae se encuentran colonizados por hongos micorrízicos, los cuales aportan nutrientes necesarios para su desarrollo y germinación, proporcionando gran cantidad de azúcares por medio de hifas que interactúan en los tejidos como raíces para proveer de nutrientes orgánicos e inorgánicos para la germinación y desarrollo oportuno del protocormo (estructura que se forma luego de la germinación de las semillas de la orquídea y partir de la cual se desarrolla una planta completa) (Guzmán Salinas & Moreno Coronado, 2014).

La mayoría de las especies de orquídeas epífitas terrestres utilizan hongos como fuente de carbono, así como las vitaminas, hormonas y aminoácidos, contribuyen al crecimiento y desarrollo de las plantas. Las plántulas de orquídeas epífitas también suelen utilizar hongos como fuente crítica de agua para la resistencia a la desecación (Yoder, Zettler, & Stewart, 2000).

También es importante el conocimiento sobre los tres tipos fisiológicos de orquídeas basados en la nutrición del carbono; especies autótrofas en el cual incluyen todos los taxones aquellas que son clorofílicas y como adultos obtienen sus compuestos de carbono a través de vías fotosintéticas; las especies totalmente micoheterotroficas (MH) dependen del carbono fúngico en todo su ciclo de vida (Leake, 1994, 2004) y un tercer tipo los mixótrofos son intermedios ya que llevan mitad fijación fotosintética del carbono y también reciben carbono fúngico (Julou et al., 2005),(Selosse, 2009).

Independientemente de su nutrición con carbono en la etapa adulta, todas las orquídeas producen semillas diminutas sin endospermo, por lo cual es importante la colonización de hongos para la germinación y el crecimiento en una etapa subterránea heterotrófica y aclorofílica llamada protocormo (Rasmussen, 1995),(S. E. Smith & Read, 2008).

### 3.2 Especies en Estudio

#### 3.2.1 *Hedyosmum cumbalense* H.Karst.

Especie de árbol de la familia de las *Chloranthaceae*, encontrado en los bosques andinos altos del Ecuador entre los 2000- 3000 msnm (Valencia *et al.*, 2000). Especie de distribución geográfica restringida, y al parecer, baja de abundancia local. Conocida por solo siete poblaciones, la mayoría al filo de las carreteras que salen de Loja hacia Zamora, Catamayo, Valladolid o Saraguro. Cuatro poblaciones se han colectado dentro del Parque Nacional Podocarpus, donde seguramente no es tan rara. Su amenaza principal es la deforestación (Valencia et al., 2000).

La lista roja de la UICN asigna la categoría en peligro a esta especie, pero se ha considerado que muchos individuos pueden estar creciendo dentro del Parque Nacional Podocarpus

(Valencia et al., 2000). En estudios posteriores esta especie se ha encontrado en la provincia de Azuay, en las localidad de Gañadel (Jadán et al., 2016).

### **3.2.2 *Cyrtochillum gyriferum***

Hierba terrestre o epífita de la familia de las Orchidaceae, ubicada en los bosques andino alto entre los 2000 y 2500 msnm (Valencia et al., 2000).

Ha sido encontrada tres veces al sur del Ecuador, una ocasión fue encontrada en el nudo de Cajanuma, dentro del Parque Nacional Podocarpus (Valencia et al., 2000).

Según Valencia et al., (2000), en 1982 se la registró por última vez, pero estudios actuales certifican que esta especie se encuentran en las zonas de Gañadel, con categoría de especie vulnerable y amenazada (Jadán et al., 2016; Valencia et al., 2000).

### **3.2.3 *Elleanthus amethystiniodes* Garay**

Hierba terrestre o epífita de la familia de las Orchidaceae, ubicada en los bosques andinos bajo hasta páramo desde los 1500 hasta los 3500 msnm (Valencia et al., 2000).

Esta especie es conocida comúnmente como “cordonilla” en el país. Encontrada en los remanentes de bosques, creciendo junto a vegetación xerofítica, en claros naturales en los bosques y en los taludes de las carreteras. Podría encontrarse dentro de las áreas protegidas Cayambe-Coca, Sumaco-Napo-Galeras y Podocarpus (Valencia et al., 2000).

Sin embargo, estudios actuales reportan que esta especie se encuentran en las zona de Gañadel, con categoría de especie vulnerable (Jadán et al., 2016; Valencia et al., 2000).

### 3.3 Hongos Endófitos

La interacción que realizan los microorganismos como los hongos endófitos, es muy importante para las plantas y tienen un efecto en la biodiversidad y estructura de las comunidades (M. . McCormick et al., 2012).

Los hongos endófitos son organismos que pueden vivir todo su ciclo o parte de su ciclo dentro del tejido vegetal vivo formándose relaciones simbióticas complejas con el hospedero (Carroll, 1995). Estos hongos no forman pelotones al interior de las células como los hongos endófitos micorrízicos (Hyde & Soyong, 2008).

La interacción hongo endófito-orquídea, permite al hongo obtener de la planta hospedera estructura espacial, protección contra la desecación y nutrientes (Schulz, 2006). Mientras que el hongo hospedero ofrece funciones como: la defensa contra los patógenos al producir metabolitos secundarios (Garibay-Orijel, Oyama, & A, 2011; Rubini et al., 2005), secreción endofítica de fitohormonas (Rey et al., 2001; Schulz, Boyle, Draeger, Rommert, & Krohn, 2002), tolerancia a estrés abiótico (J. . Barrow, 2003; J. Barrow & Aaltonen, 2001; Redman, 2002) y movilización de nutrientes a la rizósfera del hospedero; (Caldwell, Jumpponen, & Trappe, 2000; Lodge & Cantrell, 1995; Ohki et al., 2002).

La interacción entre orquídeas y microorganismos, principalmente hongos micorrízicos y endófitos, es obligatoria para la germinación de semillas y su desarrollo (García, 2003).

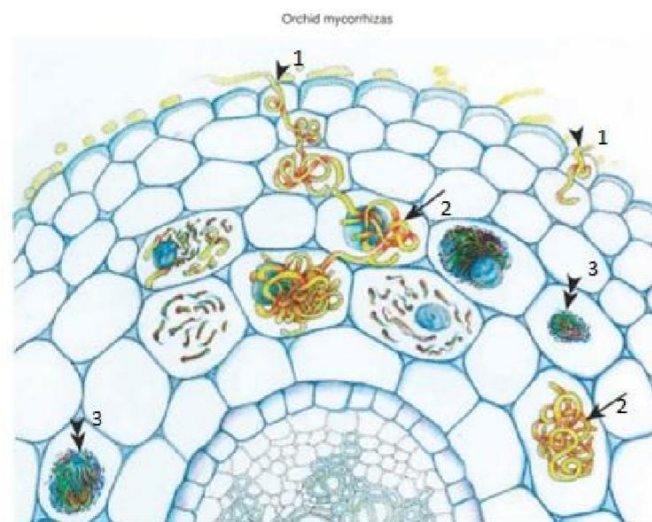
### 3.4 Hongos micorrízicos

El término micorriza, proveniente del griego mikos, hongo y rhiza, raíz, que significa “hongo raíz”, fue propuesto por Albert Berhhard Fran en 1885, para definir las asociaciones simbióticas

(vivir conjuntamente con dos o más organismos) no patógenas, entre las raíces de las plantas, mutualistas, y micelios de hongos, resultando ser beneficioso para ambos (Honrubia, 2009).

Las micorrizas son asociaciones simbióticas, mutualista, de carácter biotrófico en la que el huésped autótrofo, la planta, proporciona compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis al simbionte heterótrofo, así como un micro hábitat propio de protección. A cambio el hongo proporciona al vegetal nutrientes, azúcares indispensables para el desarrollo, minerales como el fósforo y agua, ya que las hifas son capaces de llegar más allá de la zona de influencia de la raíz (Barea & Escudero, 1980).

Se distinguen distintos tipos de micorrizas, en función de las especies fúngicas y vegetales que establecen la asociación y en función de su estrategia nutricional, que posibilita la penetración intracelular, o no por parte de las zonas corticales de la raíz del vegetal (Honrubia, 2009), los cuales son según la estructura micorrízica formada: Ectomicorrizas; Ectendomicorrizas, y las Endomicorrizas (Read, 1999), siendo este último, caracterizado por colonizar intracelularmente el córtex radical (Figura 1).



**Figura 1.** Representación de un corte transversal de una raíz de orquídea y la simbiosis micorrízica. Las hifas penetran la raíz a través de la epidermis (1) y forman los pelotones en las células corticales (2), estos pelotones se sitúan intracelularmente (3). Fuente: Petterson & Massicotte, (2004).



### 3.5 Interacción con hongos que forman micorrizas

El 90% de las especies de plantas Angiospermas forman interacciones y asociaciones micorrízicas entre las raíces y varios grupos de hongos específicos del suelo (S. E. Smith & Read, 2008).

Las especies pertenecientes a la familia Orchidaceae durante su germinación y establecimiento como plántulas dependen de hongos micorrízicos (Pettersen & Massicotte, 2004).

Las micorrizas de orquídeas son únicas, según la estructura micorrízica formada son de tipo endótrofo o endomicorrizas, caracterizadas porque las hifas del hongo viven en el interior de las células y no sólo en los espacios intracelulares, se encuentran formando pelotones que son un conjunto de hifas enrolladas localizadas en el interior de las células hospederas de la planta (Pettersen & Massicotte, 2004).

Los hongos que colonizan las principales estructuras de crecimiento (raíces, tejidos y rizomas) de las orquídeas, aportan con nutrientes que son importantes para el desarrollo de estas plantas (Pettersen & Massicotte, 2004). El rol fundamental que cumplen las hifas de estos hongos es en aportar con azúcares necesarios para el crecimiento del embrión. Aportando con nutrientes orgánicos e inorgánicos para su germinación y oportuno desarrollo del protocormo y de ahí se formara la planta completa (D. W. Dearnarley, 2007).

Los hongos micorrizicos son una parte indispensable en la vida de las orquídeas, pero poco se sabe acerca de cómo las comunidades micorrizicas son diferentes entre las poblaciones dentro de las especies o entre las especies dentro de un género. Investigaciones recientes demuestran que las comunidades micorrizicas pueden ser altamente variables entre especies o incluso entre poblaciones dentro de las especies. Al igual, entre las especies de orquídeas

coexisten las interacciones micorrizales, las cuales tienden a ser específicas de la especie y comparten poco los taxones micorrizales entre las especies de orquídeas. Por lo cual se deduce que las adaptaciones específicas del hábitat en general y la divergencia de las micorrizas en particular mantengan los límites de las especies y se midan en la coexistencia de múltiples especies de orquídeas (Esposito, Jacquemyn, Waud, & Tyteca, 2016).

Se han citado entre los hongos que forman micorrizas con orquídeas a los pertenecientes al Phylum Basidiomycota del género *Rhizoctonia* con los órdenes *Tulasnellales*, *Sebacinales*, *Ceratobasidiales* y *Atractielalles*, que han sido reportados como formadores de esta asociación simbiótica y frecuentes colonizadores de orquídeas tanto epífitas como terrestres (Otero Ospina, 2009).

La relación obligada de las orquídeas con los simbiontes micorrizicos, es importante porque constituye una herramienta de gran importancia en la germinación simbiótica de las semillas para la conservación y propagación de las orquídeas, debido a que la germinación simbiótica presenta una ventaja frente a la asimbiótica en la obtención de plantas más viables y resistentes (Zettler, Corey, Jacks, Gruender, & López, 2013).

Los estudios en micorrizas influyen en un potencial aporte para la conservación de orquídeas que se encuentran en peligro de extinción. En nuestro país es poca la información sobre la diversidad de hongos micorrízicos y el papel que desarrollan en las poblaciones de orquídeas (Guzmán & Moreno, 2014).

### **3.6 Influencia del forófito en las especies epífitas hospederas**

Es de importancia estudiar la interrelación entre los microorganismos, el árbol (forófito, especie vegetal que actúa como hospedero de patógenos o soporte de especies epífitas) y las especies epífitas. Para conocer si el árbol hospedero proporciona las condiciones óptimas y la

microbiota necesarias para el crecimiento y el desarrollo de estas especies o saber si cada especie de orquídea selecciona los microorganismos necesarios para su crecimiento y crea las condiciones específicas adecuadas para ella, aun permaneciendo como hospedero en la misma especie de forófito en la que se desarrolla otra especie de orquídea.

Estudios en orquídeas epífitas, describen que la relación existente en diferentes pisos altitudinales y condiciones climáticas propias de su origen son debidas al propio sustrato del hospedero, teniendo relaciones específicas y interespecíficas con el mismo (Paun et al., 2010), en base a ello, se hace importante profundizar conocimientos sobre la estructura, diversidad y riqueza de las comunidades de microorganismos que se encuentran asociados en las raíces y tejidos aéreos de las orquídeas (M. McCormick, Whigham, & O'Neill, 2004).

Los orígenes evolutivos del hábito epífita, explican sobre las diferentes adaptaciones y los patrones de distribución espacial observados en las comunidades epífitas actuales al interior de los bosques, alcanzando mayor expansión (Alzate & Cardona, 2000).

La distribución de las epífitas varia en dos formas: la horizontal de acuerdo al bosque y hospederos donde se desarrollan y verticalmente de acuerdo a los gradientes micro climáticos desde el piso hasta el dosel en un bosque (TER STEEGE & CORNELISSEN, 1989).

La distribución horizontal de un bosque por las epífitas, se da a través de la diversidad de microambientes y las características de diferentes hospederos que brindan diferentes oportunidades para el establecimiento, es decir; un mosaico complejo de micro hábitats que provee el medio apto para su crecimiento (Martínez-Meléndez, Pérez-Farrera, & Flores-Palacios, 2008).

Existen tres formas que las epífitas puedan establecerse en cualquier hospedero (Callaway, Reinhart, Moore, & Moore, 2002). Cuando la epífita se encuentra solo en un hospedero se

interpreta que existe especificidad de hospedero (TER STEEGE & CORNELISSEN, 1989), cuando una epífita habita varios hospederos pero está mayoritariamente en uno, se interpreta como preferencia de hospedero (TER STEEGE & CORNELISSEN, 1989), y cuando una epífita no está en un hospedero, se ha hipotetizado en este caso que ha resultado de la expulsión de la epífita por el hospedero (Benzing, 1995). Estos tres tipos de establecimiento pueden ocurrir en el mismo bosque otorgando a la comunidad de epífitas oportunidades para aumentar su diversidad.

En cambio en estratificación vertical es el resultado de la variación microclimática desde la parte alta del dosel hasta el interior del bosque y debe ser pronunciada en bosques altos y cerrados (Shaw, 2004). Esta variación está determinada por la estructura y la altura del dosel que regula la intensidad y dirección de luz recibida, la captación de humedad del aire y la temperatura del aire que llega a las plantas, por la disponibilidad de nutrientes, que está asociada a la presencia de materia orgánica muerta o briofitas en los hospederos (Martínez-Meléndez et al., 2008).

### 3.7 Análisis de las comunidades fúngicas

En el país no existen reportes respecto al nivel de diversidad de microorganismos asociados a las orquídeas de *Cyrtorchillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* que se desarrollen sobre un mismo hospedero (Valencia et al., 2000). El conocimiento de estas interacciones es importante para la propagación y conservación eficiente de la diversidad de especies que posee nuestro país (Jadán et al., 2016).

Por lo cual, es muy importante realizar el análisis de las comunidades que nos permite entender la diversidad, la estructura, las funciones, el comportamiento espacial y temporal de los microorganismos de un medio (Calderoli, 2016); Los análisis de diversidad microbiana se

refiere a dos componentes de las comunidades, la estructura que es el número de diferentes especies (Riqueza) y la uniformidad relativa del número de individuos de una muestra (Storm, 1985) y así poder conocer las diversidades de microorganismos asociadas a las raíces de orquídeas en estudio.

En el estudio de las comunidades microbianas incluye la identificación, de los microorganismos que son cultivables como de los que no son cultivables, y estos últimos se estudian en base del análisis del metagenoma con técnicas moleculares. Para estudiar a profundidad estas comunidades y determinar su biodiversidad. algunas técnicas se basan en cultivo directo, permitiendo aislar a los microorganismos y estudiar sus propiedades a partir de cultivos en laboratorio, lo que permite separar los diferentes microorganismos a través del uso de medios selectivos e incubándolos en condiciones específicas para su crecimiento (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

Sin embargo, los enfoques de clasificación molecular han mejorado la taxonomía fúngica, especialmente en el aislamiento del ADN fúngico y la secuenciación de ADN ribosomal nuclear (Selosse, 2009). Las micorrizas de las orquídeas se pueden identificar de manera más precisa y rutinaria a partir de hongos cultivados o directamente de protocormos, raíces, tubérculos y rizomas de orquídeas (Bougoure & W, 2005; Martos et al., 2009; Swarts, Sinclair, Francis, & Dixon, 2010). Para los microbios recalcitrantes al crecimiento axénico, la amplificación por PCR de tejidos de orquídeas colonizados utiliza cebadores (*Primers*) específicos para hongos, dependiendo de su especie y de su género (J. D. Dearnarley & Bougoure, 2010; J. D. Dearnarley & Le Brocque, 2006). El método de identificación de hongos micorrizicos de orquideas propuesto por Kristiansen, Taylor, Kjoller, Rasmussen, & Rosendahl, (2001), se basa en la amplificación por PCR ( *Polymerase Chain Reaction*) a partir de pelotones individuales. También es posible el análisis de diversidad a través del polimorfismo en la longitud de los

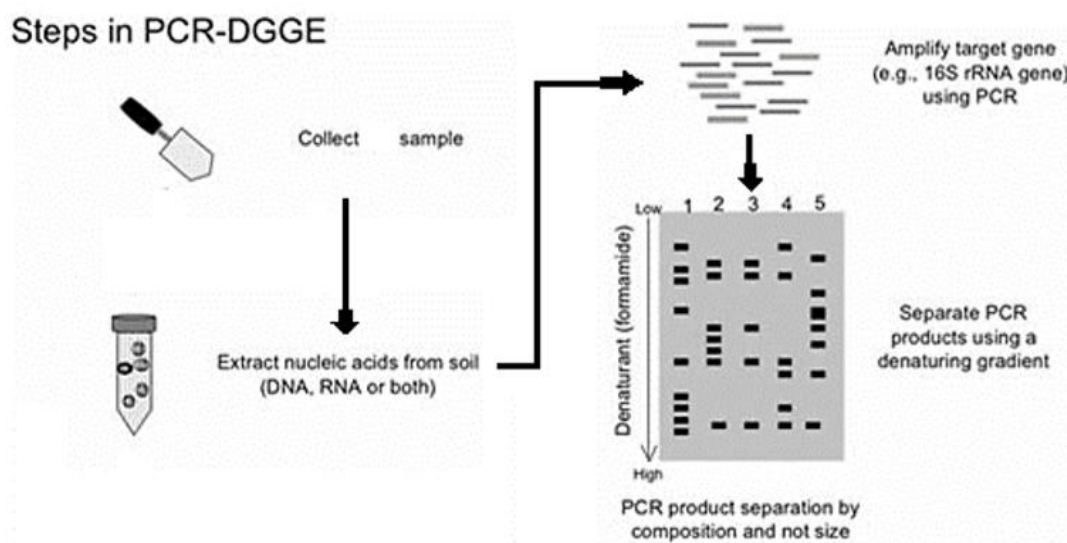
fragmentos de restricción t-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Dickie & FitzJohn, 2007), la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Bougoure & W, 2005), pirosecuenciación (Dumbrell et al., 2011), microarrays de ADN (Lievens et al., 2010), el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), la secuenciación masiva, entre otros (Kuisiene, Raugalas, Stuknyte, & Chitavichius, 2007; Madigan et al., 2009; Muyzer, De Waal, & Uitterlinden, 1993; Partanen, Hultman, Paulin, Auvinen, & Romantschuk, 2010).

El método mas elegido para identificar las comunidades microbianas o micobiontes de orquídeas en las últimas décadas, se ha realizado por medio de la secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal nuclear después de la amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando una variedad de combinaciones de los cebadores específicos (Gardes & Bruns, 1993; White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Al igual para los endófitos fúngicos se realiza el aislamiento in vitro o la amplificación por PCR a partir de tejidos de orquídeas con cebadores (*Primers*) específicos para hongos (Zhu, Yu, Gui, & Liu, 2008).

La técnica PCR permite la detección de secuencias específicas de ADN, aun cuando su abundancia sea muy escasa, y se fundamenta en la hibridación de una secuencia complementaria de un gen diana con los cebadores (*Primers*), con el fin de generar un gran número de copias de esta secuencia. La serie de ciclos sucesivos de separación de hebras complementarias, hibridación de los cebadores y polimerización se puede generar la serie de copias de la secuencia deseada (Madigan et al., 2009).

Con los productos de amplificación generados por PCR (amplicones) se puede analizar las distintas especies de microorganismos a través de la técnica de DGGE (Figura 2). La cual se

basa en separar los fragmentos del mismo tamaño pero de diferente composición nucleotídica. Dichos fragmentos se pueden visualizar como diferentes bandas en un gel de DGGE. Además, las bandas separadas se podrían extraer del gel para secuenciarlas, y así determinar el número real y la identidad de las especies presentes en una muestra ambiental o hábitat, o se podría considerar a cada banda como una unidad taxonómica operacional (OTU).



**Figura 2** .Pasos para el análisis de comunidades de microorganismos por el método de PCR-DGGE.

Fuente:(Gaona, Garza, Rodríguez, & Martínez, 2012).

Las nuevas técnicas de biología molecular han permitido describir la diversidad de microorganismos presentes en diferentes muestras ambientales (Adams & Frostick, 2009). Estas técnicas han permitido revelar la existencia de secuencias genómicas que corresponden a nuevos microorganismos no-cultivables (Partanen et al., 2010).

### 3.8 Importancia de la biotecnología en la germinación de semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas al ser pequeñas, contienen, pequeñas cantidades de lípidos y proteínas como material de reserva, sin presentar endospermo y cotiledones (Mayo Mosqueda, Cázares Camero, de la Cruz Lázaro, & Flores Hernández, 2010). Por ello, se establecen las

relaciones simbióticas con micorrizas, en la que se establece un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la germinación de semillas y desarrollo de las plantas (Weber, 2001). También la relación de simbiosis favorece la resistencia a la desecación (Yoder et al., 2000). Adaptarlas nuevamente en los bosques es poco usual y complejo ya que estas plantas deben iniciar relaciones con otros organismos en un estado adulto y no de la forma en la que se daría naturalmente (Mayo Mosqueda et al., 2010).

La biotecnología facilita los procesos de germinación de semillas a través del cultivo *in vitro* (Cueva, González, Pridgeon, & Suarez, 2009; Damon, Aguilar-Guerrero, Rivera, & Nikolaeva, 2004; Flores, Legaria, Gil, & Colinas, 2008). Al igual, facilita la aceleración en la germinación y el desarrollo de orquídeas, reportándose hasta un 90 % de germinación *in vitro* en especies endémicas del Ecuador como, *Cyrtochilum loxense* (Valencia et al., 2000).

### 3.9 Propagación de orquídeas a partir de semillas

Knudson en 1922 realizó la primera propagación de orquídeas en condiciones *in vitro* a partir de semillas de la especie *Cattleya* y más recientemente Lo et al. (2004) con *Dendrobium tosaense* y Damon et al. (2004) con *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacoensis* y *Brassavola nodosa* (Mayo Mosqueda et al., 2010).

La germinación *in vitro* de semillas de orquídeas puede ser efectuada por dos vías:

- 1).- Co-cultivo de las semillas con diversos hongos micorrízicos para establecer una relación simbiótica. Por ello es necesario el aislamiento y cultivo del hongo en un medio de cultivo específico (Mayo Mosqueda et al., 2010).



2).- Inoculación de las semillas con un medio de cultivo, sin la presencia de hongos simbióticos, en el cual el medio de cultivo proporcionan los nutrientes requeridos para el desarrollo de la semilla (Mayo Mosqueda et al., 2010).

### **3.9.1 Germinación de las semillas de orquídeas epifitas, germinación simbiótica y no simbiótica**

La germinación natural de las semillas epifitas de orquídeas descritas por Mitchell, (1989), consta de seis etapas de desarrollo fenológico, siendo la etapa 0 como semillas no germinadas y desde la etapa 2 considerado como germinación.

Etapla 0: Semillas se encuentran sin germinar.

Etapla 1: La semilla comienza a hincharse, debido a la absorción de agua produciendo el crecimiento del embrión.

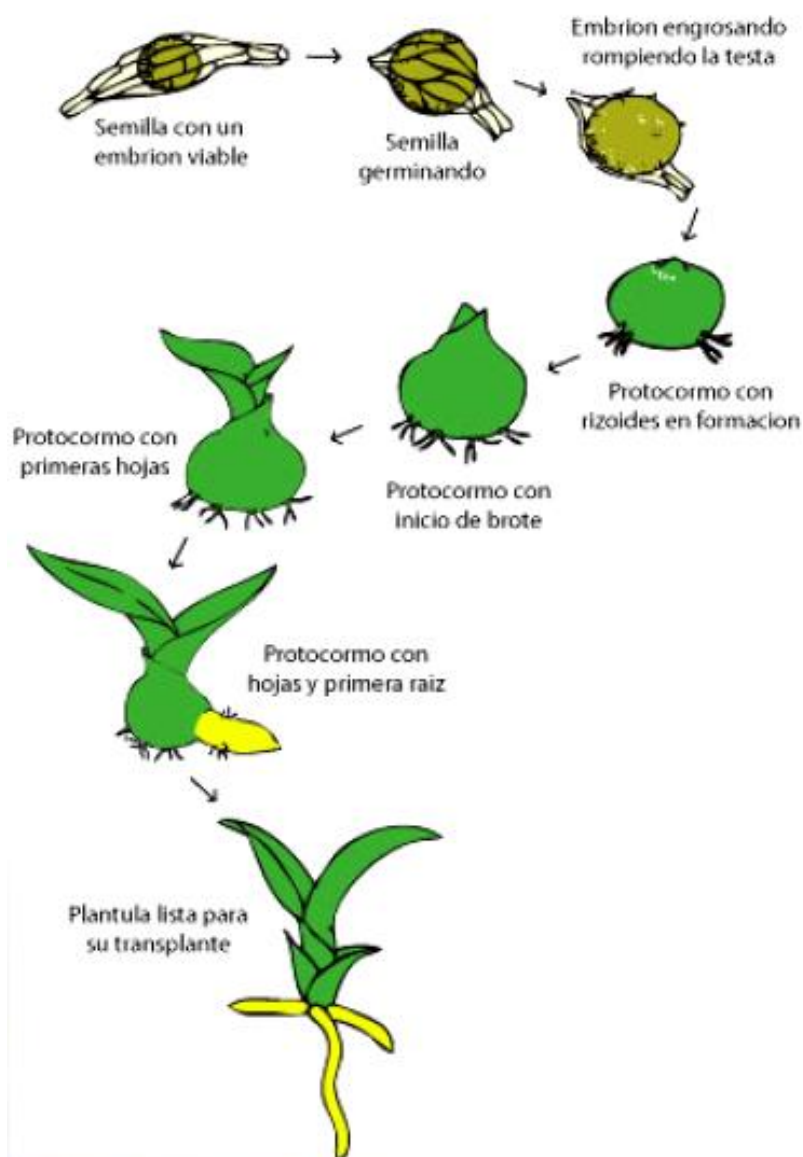
Etapla 2: Se suscita el engrosamiento del embrión (protocormo) y ruptura de la testa.

Etapla 3: Se promueve el desarrollo del protocormo y aparición de rizoides.

Etapla 4: Se produce el crecimiento rápido del protocormo y desarrollo de una yema apical.

Etapla 5: Aparición de hojas y el desarrollo de raíces que permiten el establecimiento de plántulas.

Esto seguido por un cambio en el color de la semilla a verde ya que empieza la producción de la clorofila y por ende inicio de la fotosíntesis (Seaton & Ramsay, 2005)



**Figura 3.** Estados de desarrollos de los procesos germinativos descritos por (Mitchell, 1989): Ciclo de vida de una orquídea epífita.

Fuente: (Seaton & Ramsay, 2005)

En cambio la germinación *in vitro* es el proceso por el cual se obtienen semillas en tubos, frascos de vidrio, cajas Petri de plástico o vidrio sobre un medio agar con nutrientes, azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan, en el cual existen dos tipos de germinación *in vitro*, la simbiótica y no simbiótica (Molina Cabrera, 2012).

La germinación simbiótica es la siembra de las semillas con un trozo o fragmento de la micorriza del hongo seleccionado para su crecimiento. El hongo crece en el medio, coloniza las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que alimentara al protocormo hasta que produzca hojas y se vuelva autotrófico (Molina Cabrera, 2012).

Esta técnica es adecuada para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. Teniendo la ventaja de usar un medio simple (Medio Avena), y como resultado las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas a simbióticamente y su desventaja es que se necesita obligadamente el tipo de hongo micorriza específico para que se origine la simbiosis y prevenir el parasitismo y muerte de las semillas (Molina Cabrera, 2012).

La germinación no simbiótica es usada para la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes de las zonas templadas y es un método empleado actualmente en el programa de germinación *in vitro*. El medio utilizado en esta propagación es más complejo que en la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo (Molina Cabrera, 2012).

## CAPITULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Área de Estudio

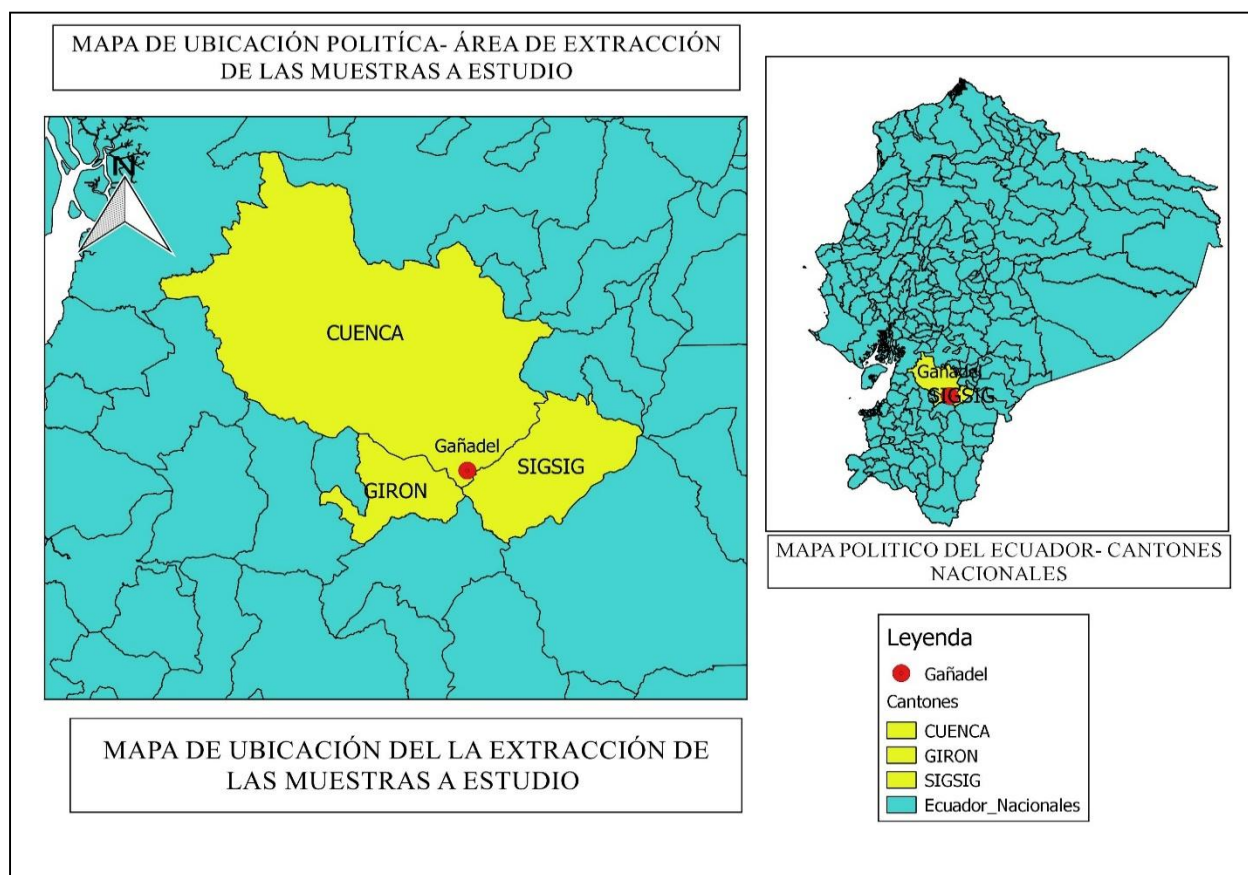
El área de estudio está ubicada dentro de la zona 6, Región Sierra, en la provincia del Azuay, en los Bosques secundarios de Lluchicarrumi (Gañadel), Llaviuco y Campanarumi (Gañadel).

En dichos sectores se extrajeron muestras de raíces de las orquídeas *Cyrtorchillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes*, que crecían sobre el forofito *Hedyosmum cumbalense*. Los sitios de colecta se encontraron dentro de ambientes climáticos similares, con cierta variación en el grado de conservación y diversidad florística. A excepción de la localidad de Llaviuco no se extrajeron muestras, ya que existieron muestras recolectadas con anterioridad por el proyecto.

**Tabla 1.** Datos generales de la ubicación de los bosques donde se recolectaron las muestras.

Bosque	Latitud	Longitud	Altitud (ms.n.m)	Temperatura media (°C)
Campanarumi (Gañadel).	-3.13348853	-79.03304815	3307	16
Lluchicarrumi (Gañadel)	-3.1455725	-79.02918577	3053	16

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



**Figura 4:** Mapa de ubicación Política donde se extraerán las muestras para el proyecto.

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

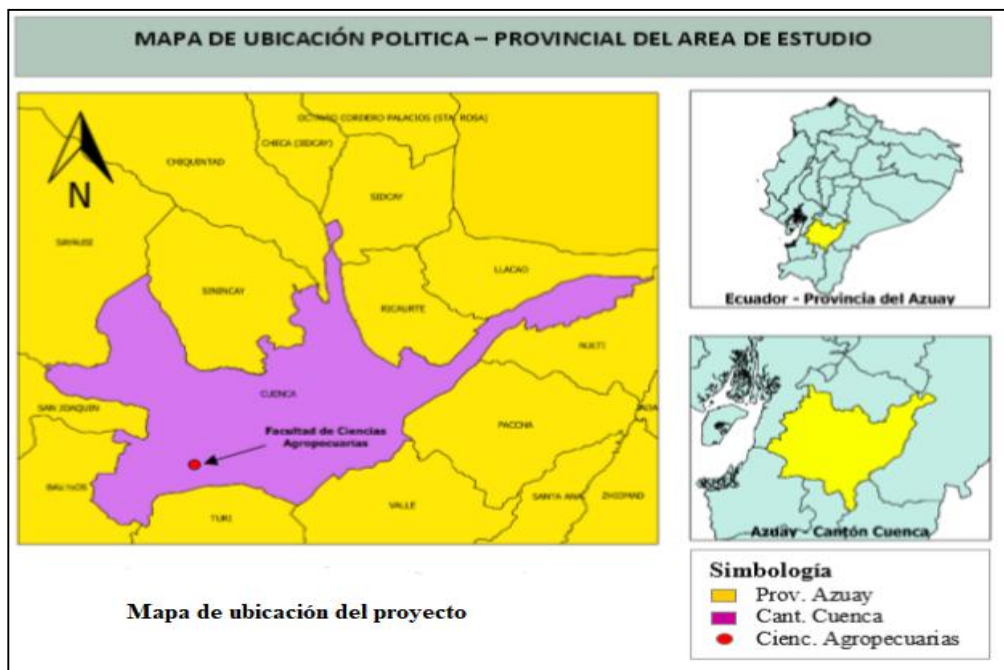


**Figura 5:** Mapa de ubicación donde se extraerán las muestras para el proyecto.

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

## 4.2. Área de Ejecución del proyecto

El trabajo de investigación se realizará en los laboratorios de Propagación *in vitro* de plantas y de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias ubicados en la parroquia Yanuncay de la ciudad de Cuenca.



**Figura 6:** Mapa de ubicación donde se realizará el proyecto.  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### 4.3. Colecta, conservación de las muestras de raíces

En los bosques de Lluchicarrumi (Gañadel) y Campanarumi (Gañadel) se colectaron semillas y segmentos de raíces de las orquídeas *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* que se encontraron desarrollándose sobre el forófito *Hedyosmum cumbalense*. Dichas muestras se almacenaron a -80 °C.

Se tomaron un total de 12 muestras de raíces de tres localidades diferentes descritas en la tabla 2, las cuales sirvieron para la identificación molecular de los hongos endófitos y para posterior procesamiento de las muestras en todo el proyecto.

**Tabla 2.** Datos generales del número de muestras colectadas en las diferentes localidades.

Localidad	Especie de orquídea	# muestras de raíces colectadas
Campanarumi (Gañadel)	<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	3
Lluchicarrumi (Gañadel)	<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	4
Lluchicarrumi (Gañadel)	<i>Elleanthus amethystiniodes</i>	3

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

Y por último, dos muestras de raíces de *Cyrtochillum gyriferum* pertenecientes al forofito de *Hedyosmum cumbalense* en la localidad de Llaviuco, estas muestras no se colectaron, ya que fueron colectadas en proyectos y estudios anteriores, manteniéndose en conservación a -80°C en los laboratorios de Propagación *in vitro* de Plantas y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, campus Yanuncay.

#### 4.4 Medios de Cultivos

##### 4.4.1 Medio FIM (Fungi Isolation Medium)

Este medio es empleado para el cultivo previo de hongos provenientes de raíces, está conformado por nitrato de sodio, cloruro de potasio, fosfato ácido de potasio y sulfato de magnesio, sacarosa y levadura, suspendidos en Agar estos ingredientes facilitan que el hongo pueda crecer y ser aislado. Adicionalmente se colocó estreptomycinina para evitar la contaminación bacteriana (Narrea, 2006; Rueda, 2004)

#### **4.4.2 Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa)**

Medio usado para el aislamiento, purificación y mantenimiento de hongos, contiene infusión de papa como fuente de almidón y la dextrosa que son la base para el crecimiento de hongos. El pH óptimo es de 5.6, evitando el crecimiento de las bacterias y es óptimo para el desarrollo de los hongos (Narrea, 2006).

#### **4.4.2 Medio OMA (Agar avena)**

Este medio es usado para la germinación simbiótica de orquídeas con hongos micorrízicos, ha sido reportado en muchos estudios, con muy buenos resultados. Se encuentra constituido por avena y agar, en este caso la avena al ser un cereal aporta azúcares y vitaminas para el desarrollo y óptimo crecimiento del hongo que servirá de apoyo para la germinación de la semillas (Zettler, Poulter, & McDonald, 2007).

#### **4.4.3 Medio Phytamax**

Este medio destacado en su importancia por tener un alto contenido de azúcar, siendo eficaz en la germinación y desarrollo de semillas. Constituido por cinco stocks ( sales minerales), vitaminas, agar y azúcar, el pH generalmente usado es de 5.6, (Narrea, 2006).

- **Metodología para la consecución del objetivo 1**

**4.5. Aislar e identificar molecularmente hongos cultivables, asociadas a las raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* Garay que crecen sobre *Hedyosmum cumbalense*.**



#### 4.5.1. Aislamiento de los hongos Endófitos

Las raíces colectadas fueron desinfectadas siguiendo el protocolo descrito por Zettler (1997) y Currah (1987), consistió en sumergir las raíces en una solución compuesta de cloro 2%-alcohol 70% y agua destilada estéril (1:1:1), durante 1 minuto y posteriormente se lavaron con abundante agua destilada estéril (2 lavados). Luego, los segmentos desinfectados de raíces de máximo 3 cm de longitud, se transfirieron a cajas Petri individuales para ser cortados en pequeños trozos con el fin de liberar pelotones o hifas de hongos endófitos. Consecuentemente, se añadió medio de cultivo nutritivo fungus isolation médium (FIM) específico para el desarrollo de los hongos, suplementado con sulfato de streptomina 300mg/l para reducir la contaminación bacteriana; por último, las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas en un sitio fresco y en oscuridad. Luego de la siembra, las cajas se revisaron a diario hasta que las hifas de los hongos sembrados se hicieron visibles, entonces, se las separó de la caja original (FIM) y se procedió a replicarlas en cajas Petri que contenían medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), con el fin de obtener cepas puras, dichas cajas se mantuvieron en un sitio fresco y en oscuridad por un tiempo aproximado de 7 días, hasta su procesamiento para el análisis molecular y su posterior identificación.

#### 4.6.1. Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenómico de raíces de *Cyrtocillium gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* total de las cepas de hongos cultivadas

De cada una de las cepas de hongos aisladas se extrajo el ADN usando el kit PureLink® genomic DNA (Thermo, Cat. K18200) (Invitrogen), la cantidad y calidad de ADN extraído se verificó mediante gel de agarosa 1%, empleando Bromuro de Etidio para la tinción y fueron visualizadas en un transiluminador UV (E-Gel® Imager System) posteriormente las muestras fueron almacenadas en tubos empendor de 1,5ml a -20°C.

#### **4.6.2. Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante la reacción de PCR convencional**

Posteriormente el ADN de cada una de las muestras se amplificó mediante una reacción de PCR tipo *touchdown* en la cual se amplificaron las regiones ITS, para ello se usaron los primers universales para hongos ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'(19 mer)) (White et al., 1990) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'(20 mer)) (Shin-Ichi, Yasuko, Nakaguchi, & Takuma, 2001) . La preparación de los reactivos, la mezcla de SuperMix, primers (ITS1 y ITS4) y las muestras se realizó en una cabina de PCR Air Science; la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler® nexus GSX1. La mezcla de reacción, que se preparó para un volumen total de 25µl estuvo compuesta por: 20 µl de solución Platinum PCR Supermix, 2µl Primer ITS1, 2 µl Primer ITS4 y 1 µl de ADN metagenómico.

El perfil térmico para la PCR utilizado ITS1 y ITS4 fue programado para 10 ciclos, usando una desnaturalización inicial de 5 min a 94° C, seguido por 10 ciclos de desnaturalización (touchdown) de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 30 s 72°C con una disminución en la temperatura de hibridación de 1°C por ciclo, seguido por 25 ciclos de hibridación de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s 72°C; seguido de una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos PCR contaron con un control positivo (muestra ya conocida) y un control negativo (sin ADN).

#### **4.6.3. Análisis de los productos obtenidos por PCR y los resultados de la electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de la amplificación obtenida se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se empleó bromuro de etidio para la tinción y se visualizó en un transiluminador Molecular imager gel DOC™ XR+ (Bio-Rad laboratories Ltd.), los productos se almacenaron en tubos empendor de 1,5ml a -20°C para conservar su uso.

Se seleccionaron un total de 9 muestras, las que presentaron un producto de amplificación bien claro y definido; los amplicones fueron enviados para secuenciación en MacroGen (Sur Korea).

Con los resultados (base de datos de cadenas secuenciadas) obtenidos de la secuenciación por parte de MacroGen (Sur Korea), se realizaron las asignaciones taxonómicas por máxima similitud entre 85 % y 100% con las secuencias publicadas en GenBank mediante una búsqueda en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Con la búsqueda realizada en BLAST se identificaron los hongos, para proseguir con el proceso de germinación del objetivo 3.

- **Metodología para la consecución del objetivo 2**

#### **4.7. Determinar la composición y los índices de diversidad de las comunidades de hongos que colonizan las raíces de *Cyrtoschellum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* en el forófito *Hedyosmum cumbalense***

##### **4.7.1. Desinfección de las muestras de raíces colectadas**

Las raíces colectadas fueron desinfectadas siguiendo el protocolo descrito por (Otero et al., 2002), por lavados sucesivos de etanol 75% durante 1 minuto, 2,5% de hipoclorito de sodio por 30 segundos, agua estéril 1 minuto, etano 75% por 1 minuto y un último lavado en agua estéril por 1 minuto. Luego, los segmentos desinfectados de raíces de máximo 3 cm de longitud, se transfirieron a cajas Petri individuales para ser cortados en pequeños trozos con el fin de liberar pelotones o hifas de hongos endófitos.

##### **4.7.2 Extracción del ADN metagenómico de las muestras de raíces colectadas**

De cada una de las muestras de raíces desinfectadas se extrajo el ADN total usando el kit PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Thermo, Cat. K1830-01) (Invitrogen), la

cantidad y calidad de ADN extraído se verificó mediante gel de agarosa 1%, empleando Bromuro de Etidio para la tinción y visualizadas en un transiluminador UV fotodocumentador (E-Gel® Imager System) posteriormente las muestras fueron almacenadas en tubos empendor de 1,5ml a -20°C.

#### **4.7.3. Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante la reacción de PCR convencional**

El ADN de cada una de las muestras de raíz se amplificó a través de una reacción de PCR tipo *touchdown* en la cual se amplificaron las regiones ITS de todos los hongos presentes en las muestras, en la amplificación se usaron primers universales para hongos ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'(19 mer)) (White et al., 1990) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'(20 mer)) (Shin-Ichi, Yasuko, Nakaguchi, & Takuma, 2001) . La preparación de los reactivos y la mezcla de SuperMix, primers (ITS1 y ITS4) y las muestras (ADN) se realizó en una cabina de PCR Air science, y la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendor mastercycler® nexus GSX1. La reacción se preparó en un volumen total de 25µl usando: 20 µl de solución Platinum PCR Supermix, 2µl Primer ITS1, 2 µl Primer ITS4 y 1 µl de ADN metagenómico.

La amplificación realizada en el termociclador fue programada para 10 ciclos, cuyo perfil térmico usado fue; una desnaturalización inicial de 5 min a 94° C, seguido por 10 ciclos de desnaturalización (*touchdown*) de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C y 30 seg 72°C con una disminución en la temperatura de hibridación de 1°C por ciclo, seguido por 25 ciclos de hibridación de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 30 seg 72°C; seguido de una extensión final de 7 min a 72°C. Para la reacción de PCR se incluyeron además con un control positivo y negativo.

#### **4.7.4 Análisis de los productos obtenidos por PCR y los resultados de la electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de la amplificación obtenida se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, empleando bromuro de etilio para la tinción y se visualizaron en el fotodocumentador Molecular imager gel DOC™ XR+ (Bio-Rad laboratories Ltd.), los productos se almacenaron en tubos empendor de 1,5ml a -20°C para conservar su uso.

#### **4.7.5 Anidación de primers y verificación de resultados por electroforesis en gel de agarosa**

Con los amplicones obtenidos se realizó una PCR anidada con los primers ITSGC (con grapa)

(5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCGCCCCTCCGTAGGTGGACC TGCGG-3'), para reducir el tamaño del amplicon, evitando la desnaturalización completa de los fragmentos amplificados.

El perfil térmico utilizado Generic 3-step PCR consistió en: una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización (touchdown) de 1 min a 94 °C, con disminución de temperatura de 1min a 55 °C y 1 min a 72 °C; seguido de una extensión final de 5 min a 72 °C, terminando en una disminución de temperatura a 10 °C. Se incluyeron además controles positivo y negativo.

Los productos de la amplificación obtenidos se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se empleó bromuro de etidio, para la tinción y se visualizó en el fotodocumentador Molecular imager gel DOC™ XR+ (Bio-Rad laboratories Ltd.), estos fueron almacenados en tubos empendorf de 1,5ml a -20°C para conservar su uso.

#### **4.7.6 Separación y fotodocumentación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

Para la separación de los productos amplificados ITSGC (con grapa) ITS4 mediante DGGE se utilizó un protocolo descrito por Fernández y Le (1984) y previamente actualizado por el personal del laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, para muestras de ADN de raíces de orquídeas y hongos endófitos. Se preparó un gel de poliacrilamida 8% (p/v) de acrilamida, la polimerización se realizó con TEMED relación 1:2 y persulfato de amonio (APS) al 10 % (p/v) relación 1:6 en un buffer TAE 0.5x. Las soluciones contenían un gradiente desnaturalizante de 20% al 35% (100% desnaturalizante contiene Urea 7 M y 40% [(v/v)] de Formamida ultrapura). También se utilizó un “*staging*” o tapón de acrilamida al 0% sin desnaturalizante tanto para la parte inferior como en la parte posterior.

Para la electroforesis se preparó y ensambló el equipo Dcode™ Universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories Ltd.), bajo las instrucciones del fabricante y del laboratorio. Para cargar las muestras se usó una mezcla de 3 µl de BlueJuice 6X y 10 µl a 15 µl de producto amplificado. Se preparó además un “pool” de mezcla como marcador con 6 µl de BlueJuice 6X y con 32 a 40 µl de mezcla de los productos amplificados. La electroforesis se realizó en un tampón TAE 0.5X, se corrió a 100 V y 60° C durante los 10 primeros minutos (corrida de prueba) y posteriormente a 80 V y 60° C durante 16 horas. El gel se tiñó con SYBR Green 2X durante 30 min en oscuridad, y las imágenes se visualizaron en una foto documentador Molecular Imager®™ XR + imaging System (Bio-Rad laboratorios Ltd.)

#### **4.7.7 Análisis de los resultados de la electroforesis de los productos obtenidos por DGGE**

Una vez obtenidos los perfiles generados por el DGGE, se determinó la riqueza de las Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) mediante el índice de Shannon-Weaver. Para ello se empleó el software Gel Analyzer 2010 (Url: <http://gelanalyzer.com/>).

Para determinar el índice de Shannon-Weaver (H) se usaron los valores de “Raw volumen” calculados automáticamente en el software Gel Analyzer, con estos datos se obtuvo el valor de la abundancia relativa ( $P_i$ ) correspondiente a la intensidad de una banda en específico. Con esto pudimos aplicar la fórmula:

$$[H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i]$$

Donde:

S = Número de bandas en cada carril

$P_i$  = Proporción entre la intensidad de una banda específica y la suma de la intensidad de todas las bandas de un mismo carril,

El valor de  $S^*$ , corresponde a la riqueza específica, y la intensidad de cada banda corresponde a la abundancia de individuos por especie, la sumatoria de todas las intensidades determinó el valor del índice de Shannon-Weaver.

- Metodología para la consecución del objetivo 3

**4.8. Evaluar el efecto fitoestimulante de hongos asociados a raíces de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes* que se desarrollan en *Hedyosmum cumbalense* sobre la germinación de sus semillas.**

#### **4.8.1. Preparación de medios de cultivos**

Se prepararon 3 litros de medio Avena Agar que sirvió como control negativo y también se utilizó para la siembra de las semillas de cada especie de orquídea con los hongos que fueron posteriormente seleccionados para el proceso de germinación, y 1 litro de medio Phytamax, que se usó como control positivo de la germinación.

#### **4.8.2. Desinfección y prueba de viabilidad de las semillas de ambas especies de orquídeas epifitas**

Las semillas colectadas de ambas especies se sometieron a pruebas de viabilidad con tetrazolium, de acuerdo al procedimiento descrito por Lakon,(1949), el cual consistió en colocar 1 mg de semillas y sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% más una gota de Tween-20 durante 15 minutos, posteriormente se lavaron y se dejaron en agua durante 48 horas en oscuridad, luego se eliminó el agua y las semillas se sumergieron en 2 ml de solución de tetrazolio, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. Finalmente se observaron las semillas por medio del microscopio y se determinó su viabilidad realizando un conteo de acuerdo a su tinción e intensidad de coloración. Si la semilla presentó un color rojo intenso se la clasificó como viable, si presentó color pálido, se clasificó como no viable, y de esta forma se calculó el porcentaje de viabilidad.



El proceso de desinfección se realizó en una cabina de flujo laminar, y consistió en: colocar las semillas en una jeringa estéril de 5ml de capacidad. (La base de la aguja de la jeringa debe contener un pequeño segmento de algodón estéril para evitar la pérdida de las semillas durante la desinfección); posterior se preparó 5ml de cloro 2% (solución desinfectante) y se succionó con la jeringa (que contiene la semilla) la solución desinfectante y se mantuvo por agitación 1 minuto; se desechó la solución desinfectante y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, para la siembra se llenó la jeringa nuevamente con agua estéril y retirando el aguja se dejó caer sobre el medio de cultivo una gota de las semillas en suspensión.

#### **4.8.3. Inoculación de las cepas puras de hongos previamente aisladas**

Las cajas en las que se sembraron las semillas de cada una de las especies de orquídea *Cyrtochillum gyriferum* (1) y *Elleanthus amethystiniodes* (2) fueron inoculadas con 1cm<sup>2</sup> del cultivo de la cepa de hongo aislada y seleccionada en base al protocolo, el ensayo se estableció de la siguiente forma:

Consistió en sembrar una repetición diariamente, por 10 días, cada repetición consistió en sembrar una caja Petri con medio avena agar + la semilla sp1, una caja Petri con medio avena agar + la semilla sp1 + la cepa de hongo seleccionada y una caja Petri con medio phytamax + la semilla sp1.

Caja 1: semilla sp1 en medio avena agar más cepa de hongo 1 (1 cm<sup>2</sup>)

Caja 2: semilla sp1 en medio avena agar más cepa de hongo 2 (1 cm<sup>2</sup>)

Caja 3: semilla sp1 en medio avena agar sin cepa de hongo

Caja 4: semilla sp1 en medio phytamax sin cepa de hongo

Caja 1: semilla sp2 en medio avena agar más cepa de hongo 1 (1 cm<sup>2</sup>)

Caja 2: semilla sp2 en medio avena agar más cepa de hongo 2 (1 cm<sup>2</sup>)

Caja 3: semilla sp2 en medio avena agar sin cepa de hongo

Caja 4: semilla sp2 en medio phytamax sin cepa de hongo

Esta siembra se repitió por diez días para así contar con 10 réplicas por especie de orquídea. Las cepas de hongos fueron seleccionadas por cada una de las especies de orquídeas.

#### **4.8.4 Análisis, evaluación del porcentaje de germinación de semillas y toma de datos de los procesos germinativos**

Luego de la siembra e inoculación de los hongos, las cajas se mantuvieron en obscuridad por 12 semanas y solo fueron descubiertas para registrar su desarrollo cada 15 días, transcurrido este tiempo las cajas se expusieron a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de obscuridad en el cuarto de cultivo del laboratorio de propagación *in vitro* de plantas.

Para cuantificar el número de semillas para cada estadio germinativo y poder determinar el porcentaje de germinación, se consideró la germinación de las semillas que hayan alcanzado la segunda etapa de germinación descrita por Mitchell, (1989), posteriormente se dibujó un cuadrante con marcador en la parte inferior de la caja Petri, el cual permitió el registro de los estadios de desarrollo, los cuales fueron fotografiados con ayuda de un microscopio electrónico mediante el software ScopeImage 9.0. y por último, se analizó y realizó la toma de datos del desarrollo de las 100 semillas sembradas en cada caja Petri, contabilizando el número de semillas en cada una de las fases de desarrollo, usando la escala

de las etapas de crecimiento germinativo de las semillas que van desde 0 al 5 según la descripción de Mitchell, (1989), descrita para la germinación de orquídeas epifitas.

#### **4.9 Análisis estadístico**

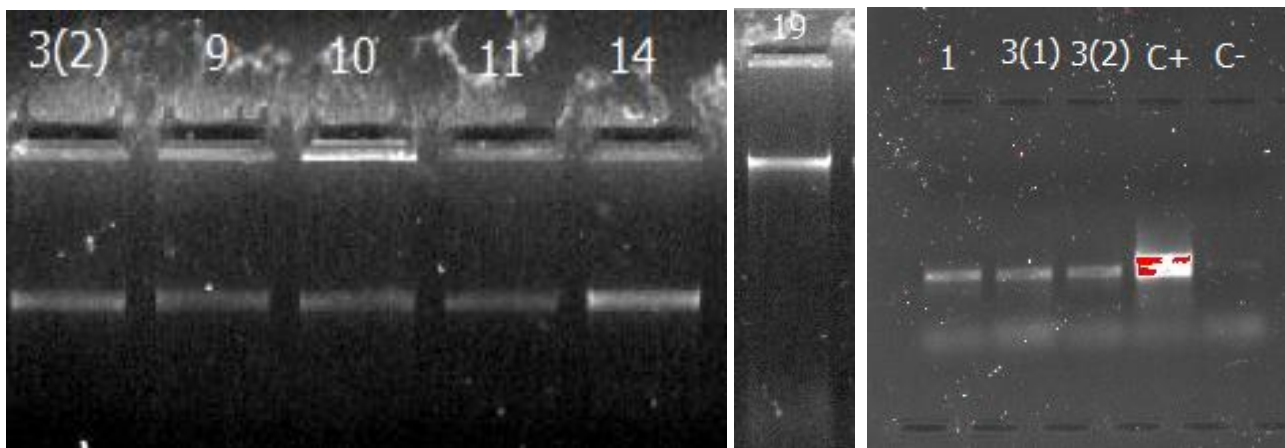
Para analizar la distribución de las variables se realizó el test de Shapiro-Wilks, si las variables que no cumplieron con una distribución normal se sometieron a una transformación a grados, y se continuó con las pruebas no paramétricas y comparación de medias.

Los resultados se analizaron mediante la prueba Kruskal Wallis con inclusión de pruebas pareadas usando el programa InfoStat al 5% de significancia.

## CAPITULO V: RESULTADOS

### 5.1 Extracción del ADN de las cepas de hongos cultivados

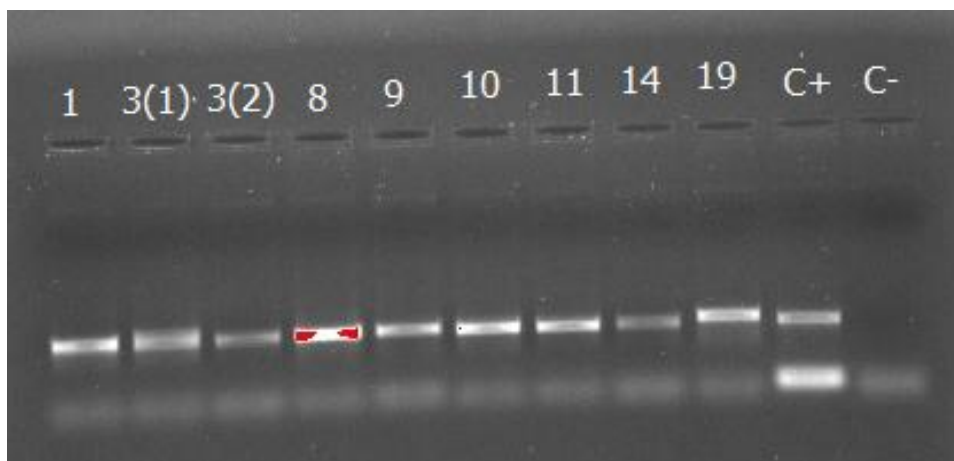
Se realizó la extracción de ADN metagenómico obteniendo ocho muestras de hongos (1; 3(1); 3(2); 8; 9; 10; 11; 14) pertenecientes a la especie *Cyrtorchillum gyriferum* y una muestra de hongo (19) perteneciente a la especie *Elleanthus amethystiniodes*. Los productos de la extracción se conservaron a -20 °C.



**Imagen 1.** Electroforesis en gel de Agarosa (1% p/v) producto de la extracción de ADN metagenómico de las muestras de hongos endófitos de dos especies de orquídeas: *Cyrtorchillum gyriferum* Hongos (1; 3(1); 3(2); 8; 9; 10; 11; 14) y *Elleanthus amethystiniodes* Hongo 19. Control positivo (C+) y Negativo (C-). Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### 5.1.2 Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante la reacción PCR de las muestras extraídas

Se realizaron 9 amplificaciones de PCR de las cuales se obtuvieron 9 productos, como se puede observar en la Imagen 2, la imagen de la electroforesis muestra las bandas de cada una de las muestras, correspondientes a los fragmentos amplificados ITS1 e ITS4. Además se observa buena intensidad de las bandas lo que indica que existió una amplificación correcta.



**Imagen 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v de los fragmentos ITS 1-ITS4 amplificados mediante PCR, a partir de los hongos endófitos de *Cyrtochillum gyriferum* Hongos (1; 3(1); 3(2); 8; 9; 10; 11; 14) y *Elleanthus amethystiniodes* Hongo 19. Control positivo (C+) y Negativo (C-).  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### 5.1.3 Análisis de los productos obtenidos por PCR y los resultados obtenidos por secuenciación en MacroGen

Los aislamientos fueron identificados con niveles de homología >80%, obteniendo resultados que se presentan a continuación, en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Identificación taxonómica de los hongos aislados secuenciados por BLAST.

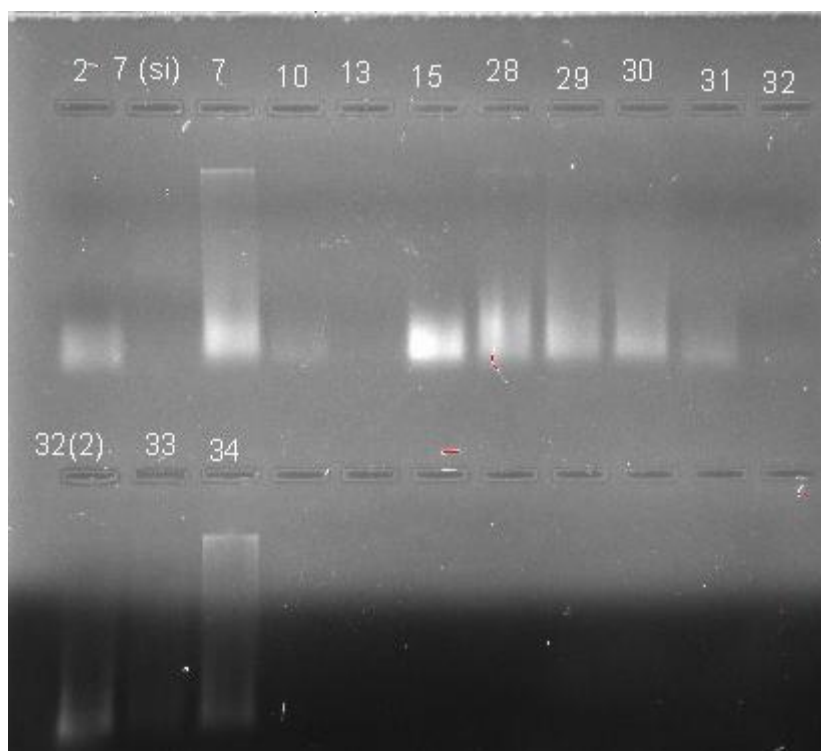
Especie de orquídea	Cepas de hongos aislados (Código origen)	Hongos	E-Value (BLAST)	Porcentaje de identificación (BLAST)	Ubicación taxonómica por BLAST
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> 10 (2)	Hongo 1	0.0	95.96%	<i>Ascomycota</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> 16(1)	Hongo 3(1)	0.0	94.82%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> 16(1)	Hongo 3(2)	0.0	94.82%	<i>Debaryomyces</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> 31 Rep	Hongo 8	4e-53	80.73%	<i>Zygomycete</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> I	Hongo 9	0.0	95.71%	<i>Ascomycota</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> 10	Hongo 10	7e-87	80.50%	<i>fungal</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> Rep 13 R	Hongo 11	0.0	97.47%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Cyrtocillum gyriferum</i>	<i>Hedyosmum cyrtochilum</i> 11(3)	Hongo 14	0.0	98.88%	<i>fungal endophyte.</i>
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	<i>Elleanthus Amastheroides</i> HR34	Hongo 19	0.0	98.65%	<i>Ascomycota</i>

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

Se obtuvieron los siguientes grupos taxonómicos : división: *Ascomycota*, especie: *Meyerozyma guilliermondii*, género: *Debaryomyces*, clase: *Zygomycete*, especie: *Pichia guilliermondii* y *fungal endophyte*. En la tabla 3, se describió que tipo de hongo secuenciado fue correspondiente para cada grupo taxonómico con mayor porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas.

## 5.2 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenómico total de las muestras de raíces colectadas

Se obtuvieron un total de 12 muestras con sus respectivas bandas, describiendo la existencia de ADN metagenómico en el que se pueden observar en la Imagen 3. *Cyrtorchillum gyriferum* con 9 extracciones (2, 7, 10, 13, 15, 29, 31, 32, 33) y *Elleanthus amethystinoides* con 3 extracciones (30, 28, 34). Los productos de la extracción se conservaron a -20 °C.



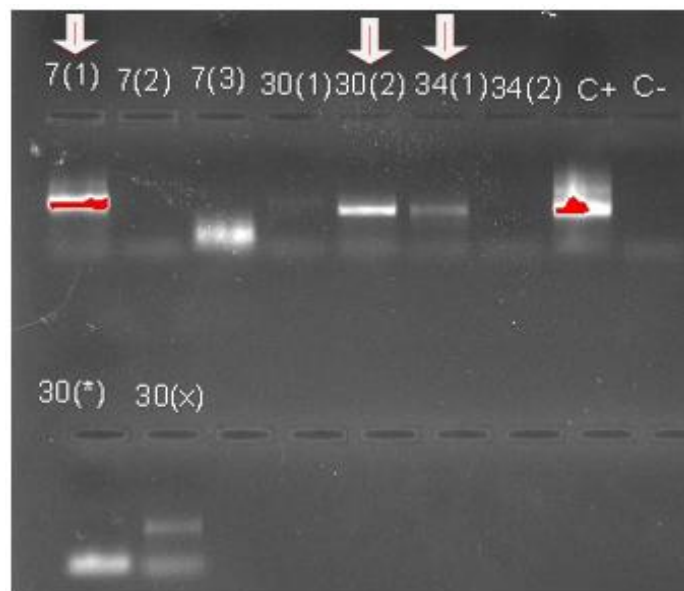
**Imagen 3.** Electroforesis en el gel de agarosa al 1% p/v producto de la extracción de ADN metagenómico de las muestras de raíces de orquídeas. *Cyrtorchillum gyriferum* raíces (2, 7, 10, 13, 15, 29, 31, 32, 33) y *Elleanthus amethystinoides* raíces (30, 28, 34).

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### 5.2.1 Amplificación (PCR) de marcadores moleculares fúngicos en muestras de raíz

Se realizaron 11 amplificaciones (PCR) En la Imagen 4 se presenta la imagen del gel de electroforesis en donde se pueden observar las bandas de cada una de las muestras, correspondientes a los fragmentos amplificados ITS1 e ITS4.

Los resultados obtenidos la amplificación (PCR) fueron 3 muestras, dos muestras obtenidas para *Elleanthus amethystiniodes* (30(2) y 34(1)) y una muestra para *Cyrtocillium gyriferum* (7(1)). Las muestras se mantuvieron en conservación a -20°C.



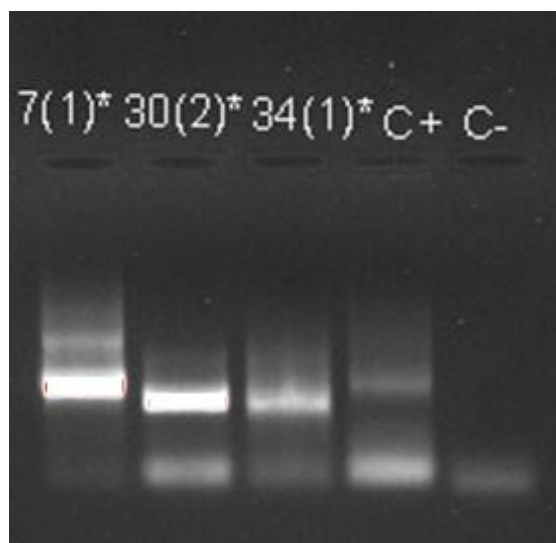
**Imagen 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v de los fragmentos ITS1-ITS4 amplificados mediante PCR producto de la extracción de ADN metagenómico de las muestras de raíces de orquídeas. *Cyrtocillium gyriferum* raíces 7(1), 7(2), 7(3) y *Elleanthus amethystiniodes* raíces (30(1), 30(2), 30(\*), 30(x), 34(1), 34(2). Control positivo (C+); Control negativo (C-).  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### 5.2.2 Segunda amplificación (PCR) con anidación y grapas en muestras de raíz

En este proceso se realizó la amplificación por PCR con anidada usando los primers ITSGC (con grapa) e ITS4, es decir que a éstos cebadores se les añadió una cola de nucleótidos (C y G). En el cual se obtuvieron 3 productos amplificados como se observa en la Imagen 5, las cuales fueron dos muestras de raíces de *Elleanthus amethystiniodes* 30(2),



34(1), y una muestra de *Cyrtochillum gyriferum* 7(1), estas muestras fueron las que presentaron la mayor intensidad de las bandas.



**Imagen 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v de los fragmentos ITS4C (con grapa) ITS4 amplificados mediante PCR anidada del ADN metagenómico de muestras de raíces de orquídeas. *Cyrtochillum gyriferum* raíces 7(1) y *Elleanthus amethystiniodes* raíces 30(2), 34(1). Control positivo (C+); Control negativo (C-). Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

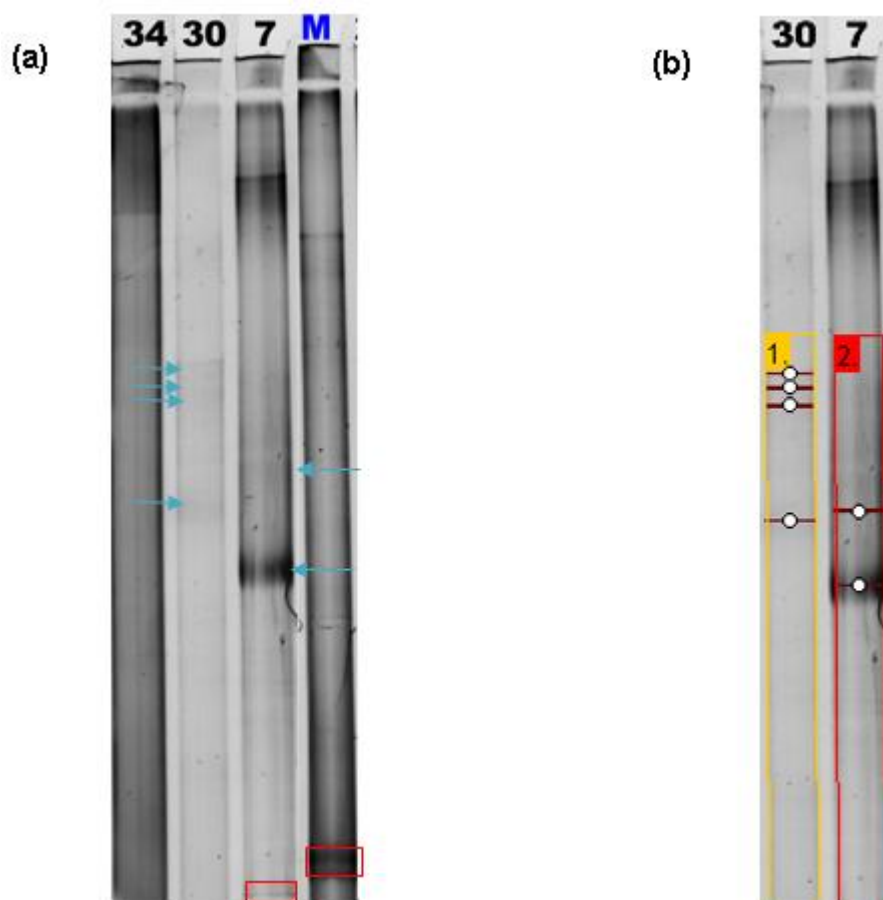
### 5.2.3 Separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante DGGE

Los parámetros para un adecuado DGGE se establecieron previamente por personal y estudiantes del laboratorio de biología molecular de la Universidad de Cuenca (FCCAA). Como se observa en la Imagen 6 (a) y (b), la definición de las bandas no es clara {Imagen 7 (a)}, por lo cual con el programa Gel Analyzer 2010 (Url: <http://gelanalyzer.com/>) se pudo identificar que bandas obtuvieron mayor intensidad y se observan patrones con bandas de diferentes intensidades {Imagen 6 (b)}, esto se logró con un gradiente desnaturalizante entre 20% y 35%, evitando así la acumulación de bandas en la parte central del gel.

Cada uno de los patrones (carriles) obtenidos en el DGGE representa a la población de las comunidades de hongos endófitos presentes en las raíces de orquídeas y de cada especie de raíz de orquídea estudiada. Cada banda representa un grupo de hongo endófito diferente, y la

intensidad de cada banda representaría la cantidad de microorganismos de una determinada especie. Se obtuvieron tres productos amplificados más un marcador molecular, de los cuales la muestra 34 se degradó en el proceso de amplificación, por lo cual se analizaron las bandas presentes en cada muestra, representando la muestra 7 *Cyrtocillium gyriferum* y la muestra 30 de *Elleanthus amethystiniodes*, se observaron que la concentración de ADN cargado para cada carril es diferente, al igual que del Marcador (M), teniendo un conteo de número de bandas diferentes para cada muestra. La cantidad de bandas cargadas observadas denotan menor intensidad en las bandas dificultando el conteo de bandas presentes en cada muestra, y esto se podría deber a que la purificación no resultó muy exitosa para las muestras y/o inhibidores dificultaron una correcta amplificación generando falsos positivos al momento de la cuantificación, o la pérdida de una alta cantidad de ADN al momento de la purificación o al momento de amplificación de las bandas (Howeler, Ghiorse, & Walker, 2003).

En el análisis de las comunidades presentes en cada banda de cada línea correspondiente a una muestra específica se observó la presencia de bandas dobles denominadas heteroduplex, las cuales se encuentran fuera del análisis ya que hacen referencia a mutaciones aleatorias; se logran visualizar en la Imagen 7 (a) con recuadro rojo. Se logró observar que para cada muestra existen bandas que están presentes en una o en la otra muestra cómo están marcadas con flecha celeste, lo que indicaría que existe diferencia de comunidades de hongos endófitos de una respectiva muestra.



**Imagen 6.** Perfil de DGGE con rango desnaturalizante de 20% a 35% para ITS4 (con grapa) ITS4 en comunidades de hongos endófitos presentes en raíces de orquídeas, en las especies de *Elleanthus amethystinoides* (muestra 30) y *Cyrtochillum gyriferum* (muestra 7). (a) Productos amplificados de las muestras 7; 30 y marcador, (b) Productos amplificados con análisis de bandas de cada muestra por medio del software GelAnalyzer2010.

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

#### 5.2.4 Análisis de riqueza de las comunidades de hongos endófitos presentes en cada muestra amplificada

Para el cálculo de los índices de riqueza cada banda se consideró como un taxón presente en la comunidad (carril). Se analizó la diversidad y riqueza, Shanon-Weaver (H), para cada muestra, con ayuda del software Gel Analyzer 2010 (Url: <http://gelanalyzer.com/>), como se puede observar en las tablas 4 y 5.

En la tabla 4, se representa la diversidad de la muestra 30 de *Elleanthus amethystiniodes* con un valor de 1.0217 calculado mediante el índice de Shanon-Weaver (H), siendo un valor bajo de diversidad, ya que la mayoría de los ecosistemas naturales varía en el rango de 2 y 3 como normales en diversidad microbiológica (Pla, 2006). El valor definido para la riqueza fue de 4 (número de bandas).

**Tabla 4.** Valores de índice de diversidad e índice de riqueza de las comunidades de hongos endófitos presentes en la raíz de orquídea de *Elleanthus amethystiniodes* muestra 30.

Banda	Intensidad de la banda	Abundancia Relativa	Valores absolutos (pi)	Diversidad Shanon-Weaver (H)	Riqueza
1	315	0.2470588	-0.3454200	1.0217043	4
2	236	0.1850980	-0.3122362		
3	403	0.3160784	-0.3640480		
4	321	0.2517647	-0.3472490		

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

En la tabla 5, se representa la diversidad de la muestra 30 de *Cyrtocillum gyriferum* con un valor de 0.6319 calculado por el índice de Shanon-Weaver (H), siendo un valor bajo de diversidad, ya que la mayoría de los ecosistemas naturales varía en el rango de 2 y 3 como normales en diversidad microbiológica (Pla, 2006). Y con una riqueza de 2 (número de bandas).

**Tabla 5.** Valores de índice de diversidad e índice de riqueza de las comunidades de hongos endófitos presentes en la raíz de orquídea de *Cyrtocillum gyriferum* muestra 7. A partir de la amplificación generada por el proceso DGGE.

Banda	Intensidad de la banda	Abundancia Relativa	Valores absolutos (pi)	Diversidad Shanon-Weaver (H)	Riqueza
1	385	0.32682512	-0.3654983	0.6319074	2
2	793	0.67317487	-0.2664090		

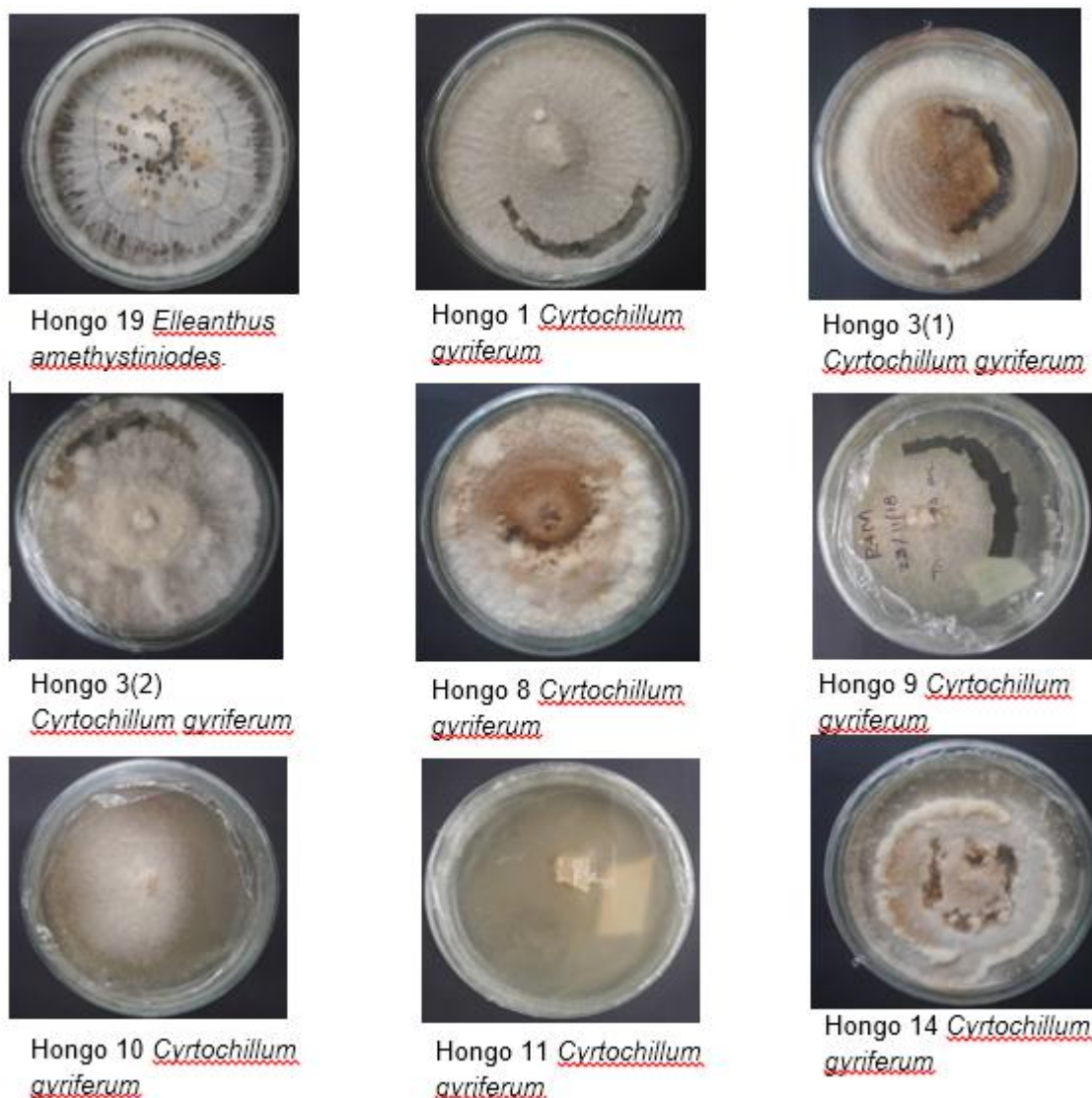
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### **5.3 Viabilidad de las semillas de orquídeas de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes***

Según Lakon, (1949) los porcentajes de viabilidad de semillas mayores al 70 % luego de ser expuestas a pruebas de tetrazolio tienen mayor probabilidad de proporcionar una germinación alta. Las semillas de *Cyrtochillum gyriferum* obtuvieron una viabilidad del 92% y la especie *Elleanthus amethystiniodes* un porcentaje del 85% (Anexo 7).

#### **5.3.1 Ensayo de germinación simbiótica**

Se obtuvieron un total de nueve hongos que fueron en todo el ensayo (Imagen 8). en las semillas de *Elleanthus amethystiniodes* se inoculo únicamente con el hongo 19 y se incluyeron dos controles, medio Phytamax (control positivo) y Medio Avena Agar, sin hongo (control negativo) para cada una de las 10 repeticiones. El mismo procedimiento se siguió para la especie *Cyrtochillum gyriferum*, usando 8 cepas de hongos sobrantes. Teniendo un total de 120 cajas Petri que fueron inoculadas con cepas puras de hongos y sembradas con las semillas de orquídeas respectivas de cada especie (Anexo 11).

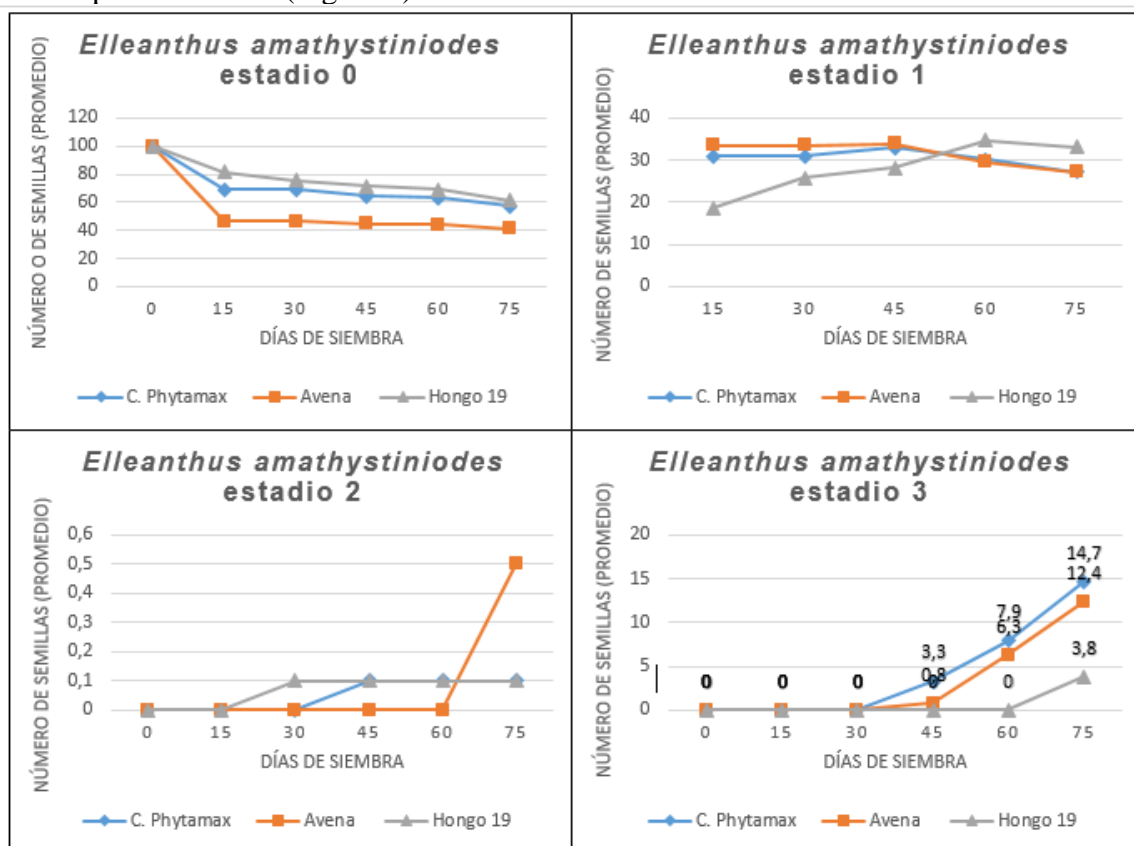


**Imagen 7.** Morfología de colonias de los nueve hongos aislados con anterioridad que fueron inoculados con semillas de ambas especies de orquídeas de *Elleanthus amethystiniodes* y *Cyrtorchillum gyriferum*.  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

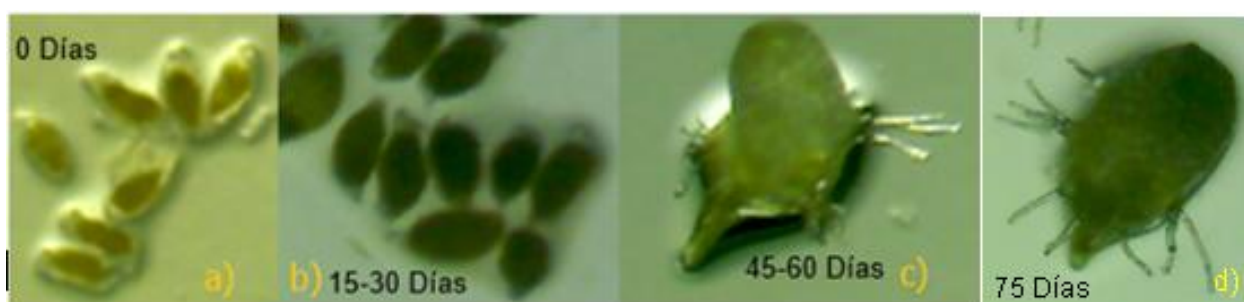
### 5.3.2 Germinación simbiótica de semillas orquídeas

Los resultados para *Elleanthus amethystiniodes* mostraron un efecto promotor fito-estimulante por parte ambos controles, existió germinación baja por parte del hongo 19, obteniendo un promedio de número de semillas germinadas de 3.8 que alcanzaron hasta el estadio 3 en el período de tiempo establecido de 75 días; pero fue significativamente superior el control positivo medio Phytamax con un promedio de número de semillas germinadas de 14.7 llegando hasta el estadio 3; y para el control negativo Medio avena Agar con un promedio

de número de semillas germinadas de 12.4 que alcanzaron en el estadio 3 en el mismo período de tiempo establecido (Figura 7).



**Figura 7.** Promedio de la Germinación simbiótica de las semillas de *Elleanthus amethystiniodes*, en el desarrollo fenológico de sus tres estadios en un período de 75 días luego de su siembra.  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

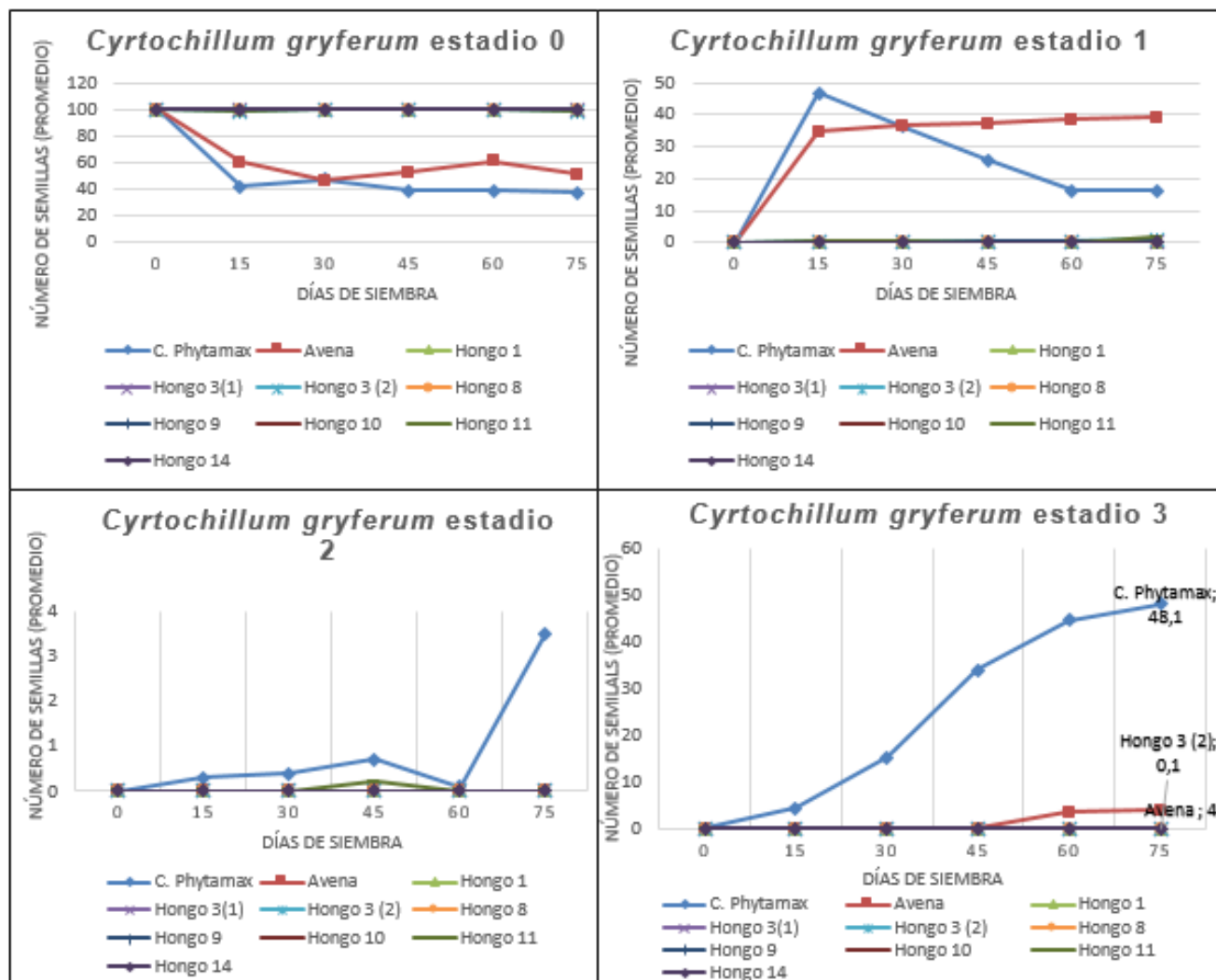


**Imagen 8.** Germinación simbiótica de semillas de *Elleanthus amethystiniodes* y desarrollo de los estados germinativos de 0 a 75 días después de la germinación (DAG). a) Semillas en estado original (0DAG), b). Estadio 0 (semillas hidratadas (15-30DAG), c) Ruptura de la testa y aparición de rizoides (45-60) DAG, d) aparición de rizoides (75DAG), en presencia del tratamiento Phytamax.  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

Para el caso *Cyrtocillium gyriferum*, los hongos evaluados no mostraron un efecto fito-estimulante, obteniéndose un promedio de número de semillas germinadas de 0.1 para el

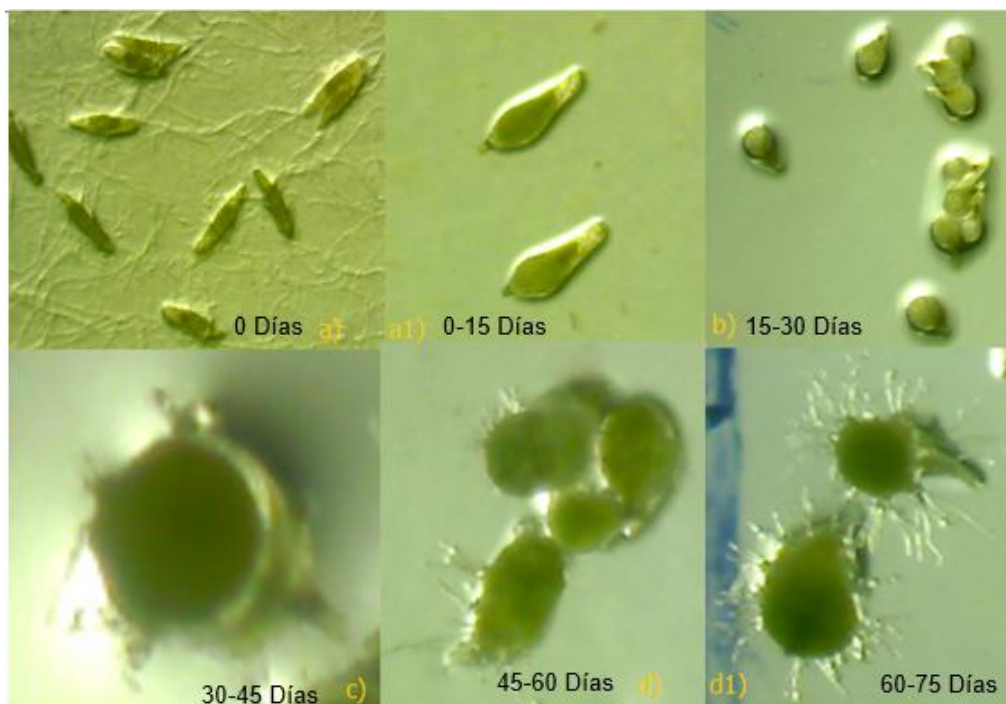


estadio 3, con el hongo 3(2), luego de 75 días de la inoculación. El control positivo (medio Phytamax) fue muy superior, con un promedio de 48.1 semillas germinadas, que alcanzaron el



**Figura 8.** Promedio de la Germinación simbiótica de las semillas de *Cyrtocillium gryferum*, en el desarrollo fenológico de sus tres estadios en un período de 75 días luego de su siembra.  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.





**Imagen 9.** Germinación simbiótica de semillas de *Cyrtochillum Gyriferum* y desarrollo de los estados germinativos de 0 a 75 días después de la germinación (DAG) a) y a1) semillas en estado original (0-15 DAG), b). Estado 0 (semillas hidratadas) (15-30 DAG), c) Ruptura de la testa (30-45DAG), d) aparición de rizoides (45-60 DAG), d1) aparición de rizoides (60-75 DAG), en presencia del tratamiento Phytamax.  
Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

### 5.3.3 Porcentaje de germinación de las dos especies de orquídeas en sus tres estadios de desarrollo luego de 75 días de inoculación con hongos endófitos

Según Mitchell, (1989) el porcentaje de semillas es determinado por la cantidad de semillas que han alcanzado la segunda etapa de desarrollo germinativo, acumulando la semilla cierta cantidad de agua en el embrión para que dé inicio el proceso germinativo y subsiguiente el desarrollo del protocormo. A partir de este enunciado, podemos decir que no se evidenciaron efectos fito-estimulantes por parte de los hongos inoculados en la especie *Cirtochillum gyriferum*, ya que la mayoría no llegan al estadio 2, a excepción del control Phytamax, tratamiento en el cual las semillas llegaron hasta los estadios 2 y 3. Para la especie *Elleanthus amathystinioides* los controles positivo (medio Phytamax) y negativo (medio

Avena Agar) se observó germinación y desarrollo hasta el estadio 3, en las dos especies de orquídeas *Elleanthus amathystiniodes* y *Cirtochillum gyriferum* luego de 75 días. La Tabla 4 presenta los resultados obtenidos con sus respectivos errores estándar .

**Tabla 6.** Porcentaje de Germinación durante los tres primeros estadios de desarrollo de las semillas (promedios con errores estándar) de *Elleanthus amathystiniodes* y *Cirtochillum gyriferum* inoculadas con las diferentes cepas de hongos endófitos, luego de 75 días de su inoculación.

Especies de orquídeas	Tratamientos	# de semillas sembradas	Estado 0 (No germinadas)	Estado 1 (Semilla hidratada)	Estado 2 (Ruptura de la testa)	Estado 3 (Aparición de rizoides)	%Germinación
<i>Elleanthus amathystiniodes</i>	Phytamax (+)	100	57.1±9.4	28.1±5.9	0.1±0.1	14.7±4.7a	14.8±4.7a
<i>Elleanthus amathystiniodes</i>	Medio Avena Agar (-)	100	61.3±11.9	26.3±7.3	0.48±0.48	11.8±4.6a	12.9±5a
<i>Elleanthus amathystiniodes</i>	Hongo 19	100	61.7±10.5	33.1±8.1	0.1±0.1	5.1±2.7a	3.9±2.4a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Phytamax (+)	100	37.04±10.3	11.9±3.2	3.5±2.3	48.1±9.6b	51.6±10.5b
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Medio Avena Agar (-)	100	58±11.6	38.1±11.1	3±1.9	3.9±2.4a, b	4±2.3a, b
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 1	100	99.8±0.1	0.2±0.1	0±0	0±0a	0±0a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 3 (1)	100	100±0	0±0	0±0	0±0a	0±0a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 3 (2)	100	98.8±0.7	98.9±0.7	0±0	0.1±0.1a	0.1±0.1a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 8	100	99.9±0.1	0.1±0.1	0±0	0±0a	0±0a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 9	100	99.8±0.1	0.2±0.13	0±0	0±0a	0±0a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 10	100	99.9±0.1	0.1±0.1	0±0	0±0a	0±0a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 11	100	98.5±0.7	1.5±0.7	0±0	0±0a	0±0a
<i>Cyrtochillum gyriferum</i>	Hongo 14	100	100±0	0±0	0±0	0±0a	0±0a

Nota: Todos los datos muestran sus errores estándar ±.

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

Diferencia estadística con letras diferentes (a, b) para cada bloque de tratamiento, indicando significancia estadística ( $p=0.001$ ) entre el grupo de hongos y sus tratamientos utilizados, según la prueba no paramétricas de Kruskal Wallis al 5% de significancia.

## CAPITULO V: DISCUSIÓN

En el presente estudio, los 9 hongos cultivables obtenidos corresponden al grupo de hongos endófitos no micorrizicos. Los hongos identificados en la especie *Cyrtocillium Gyriferum*, pertenecen a los géneros *Ascomycota* , *Meyerozyma* , *Debaromyces* , *funga* sp y al *phylum Zygomycete* perteneciente a la familia Zygomycota, son géneros comunes de hongos endófitos encontrados en campo, según Sánchez-Fernández et al (2013) y Salazar (2017) ,reportan que a las familias del *phylum* Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota ; Oomycota; y de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Meyerozyma* o *Candida*, *Botryobasidium* y *Trametes* como hongos endófitos presentes en orquídeas epífitas en bosques montanos andinos del sur del Ecuador.

En cambio para la especie *Elleanthus amethystiniodes*, se encontró que el hongo cultivado *funga*, pertenece dentro del grupo de hongos que aportan como endófitos en ciertos tipo de plantas epifitas. Wemheuer, Thomas, & Wemheuer (2019), describe que los hongos pertenecientes a los grupos *funga endophyte*, cumplen roles importantes en el crecimiento y desarrollo de orquídeas epifitas al estar relacionadas con un gran número de hongos pertenecientes a comunidades endófitas de las principales familias como Aphelidiomycota, Ascomycota y Basidiomycota.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la composición y los índices de diversidad en las comunidades de hongos no cultivables, presentaron una baja diversidad de microorganismos, probablemente, debido a una degradación del ADN extraído de las muestras, antes de su

amplificación, ya que éstas fueron expuestas varias veces al proceso de congelamiento ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento. Según Howeler, Ghiorse, & Walker, (2003), los valores bajos en el número de bandas amplificadas puede deberse a que las muestras de raíces de orquídeas no se encuentran en buenas condiciones, haciendo que el ADN de los microorganismos presentes se degrade y por ello la extracción no resulte exitosa, por otra parte, posibles inhibidores pudieron dificultar la amplificación generando falsos positivos al momento de la cuantificación.

Las muestras de raíces de hongos no cultivables presentaron una baja diversidad con una riqueza de 4 (número de bandas): Salazar (2017), reporta una relación de 4:1 hongo:planta en el que incluye patógenos y endófitos cultivables, valor que concuerda con lo obtenido en el presente estudio. Arnold y Lutzoni (2007), concuerdan que estudios de diversidad y riqueza de hongos endófitos han permitido hipotetizar que una planta puede ser colonizada por al menos un hongo endófito.

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto fito-estimulante de los hongos cultivables en la germinación de las semillas de *Cyrtochillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes*, evidenciaron que, los hongos cultivables evaluados no presentan efecto estimulante en la germinación de las semillas evaluadas, lo que concuerda con lo expuesto en los resultados del primer objetivo, pues, los hongos cultivables que fueron aislados pertenecen a géneros de hongos endófitos y no micorrizicos; Otero, Mosquera, & Flanagan, (2002), indican que la especificidad de hongos endófitos en la relación planta-hongo es reducida, lo que demuestra que dichos hongos endófitos no aportan con la germinación y más bien favorecen a factores no compatibles como la inhibición de la germinación o que los hongos actuaron como agentes no compatibles, siendo patógenos evitando el crecimiento y desarrollo de las semillas. Al igual Otero Ospina, (2009), confirma que dichos hongos endófitos pueden actuar como agentes patógenos no compatibles en relación con la planta epífita, ya que cada hongo puede ser

relativamente específico para cierta especie de orquídea. Chávez (2014), describe que los hongos endófitos pueden estar enfocados a las variables que rigen en su entorno natural para el desarrollo de la germinación favoreciendo a la interacción entre la planta-hongo, en este estudio no se obtuvo un efecto promotor en la germinación de las semillas a diferencia de otros hongos, no evaluados en este trabajo, que presentaron un efecto promotor de la germinación, al desarrollarse el experimento en las mismas condiciones a las que se expusieron nuestros tratamientos.

En cambio, las placas sembradas con los tratamientos control (positivos y negativo) presentaron germinación, deduciéndose con ello que las semillas se encontraron en buenas condiciones de viabilidad e indicando, además, que el control Phytamax fue eficiente para la germinación de semillas en ambas especies de orquídeas, al contrario de los hongos cultivables aislados con los que no se obtuvo germinación en el mismo periodo de tiempo.

## CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- Se analizaron e identificaron un total de 9 hongos cultivables, agrupados en 5 géneros: *Ascomycota*; *Meyerozyma* ; *Debaryomyces* ; *Zygomycete*; *Pichia*, más un aislado que se identificó dentro del grupo taxonómico de hongos endófitos “*fungal endophyte*” y uno identificado únicamente como una cepa fungica “*funga*”.
- Los resultados de la composición y los índices de diversidad e índice de riqueza de las muestras de raíces en ambas especies de orquídeas fueron bajos, al evaluarlos mediante el índice de Shannon-Weaver (H). Sin embargo, y considerando otros trabajos similares, en los que la diversidad fúngica es considerablemente superior, asumimos posibles errores metodológicos durante el almacenamiento de las muestras.
- El efecto fito-estimulante por parte de los hongos aislados en la germinación de las semillas de *Cyrtocillum gyriferum* y *Elleanthus amethystiniodes*, fue negativo. En

cambió el control negativo (sin hongo), en medio Phytamax, permitió obtener germinación en ambas especies de orquídeas en el mismo periodo de tiempo, concluyendo que las semillas si fueron viables y no fueron fito-estimuladas por parte de los hongos asilados, concluyendo que los hongos endófitos evaluados no benefician la germinación de las semillas en las plantas especies evaluadas.

## RECOMENDACIONES

En el proceso de aislamiento y purificación de los hongos, es crítico tener en cuenta las normas de higiene para evitar contaminación de las muestras.

Previo al proceso de extracción de ADN es importante usar muestras frescas o conservarlas en congelación y descongelarlas una sola vez, ya que el proceso de congelamiento y descongelamiento repetitivo, daña las muestras.

Por ello se recomienda guardar las muestras en varias partes para no descongelar la misma muestra repetidas veces y de igual forma para las muestras de ADN extraídas, se recomienda dividir las en alícuotas, hasta que se consiga estandarizar los protocolos de amplificación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdelnour, A., & Vega, M. (2013). Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica. In M. In González (Ed.), *M.e.In González* (Crioconser, pp. 113–126). San Jose.
- Adams, J. ., & Frostick, L. . (2009). Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. *Waste Management*, 29(2).
- Alzate, G. F., & Cardona, N. F. (2000). *Patrones de distribución de epífitas vasculares en "Robledales."* 53(1). Retrieved from:<https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/download/24070/24706%3A%3Apdf>
- Arnold, A. ., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots. In *Ecology* (pp. 541–549). Retrieved from <http://doi.org/10.1890/05-1459>
- Barea, J. M., & Escudero, J. L.-A. (1980). effects of introduced and indigenous VA mycorrhizalfungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P fertilizaers. *Plant and Soil*.
- Barriuso, J., Santafé, M., Solis, Z. K., & Sánchez, S. (2015). Las micorrizas en los sistemas agroforestales. *Research Gate*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/279188543>
- Barrow, J. . (2003). Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, 13(5), 239–247. Retrieved from <http://doi.org/10.1007/s00572-003-0222-0>
- Barrow, J., & Aaltonen, R. (2001). Evaluation of the internal colonization of *Atriplex*

- canescens (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 11(4), 199–205. Retrieved from <http://doi.org/10.1007/s00572-003-0222-0>
- Benzing, D. (1995). Vascular Epiphytes. *Academic, San Diego*.
- Bougoure, D. S., & W, C. J. (2005). Fungi associated with hair roots of *Rhododendron lochiaie* (Ericaceae) in an Australian tropical cloud forest revealed by culturing and culture-independent molecular methods. *Environ Microbiol*, 7.
- Calderoli, P. (2016). *Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos*.
- Caldwell, B. ., Jumpponen, A., & Trappe, J. M. (2000). Utilization of major Detrital Substrates by Dark-Septate, Root Endophytes. *Mycologia*, 92(2), 230–232. Retrieved from <http://doi.org/10.2307/3761555>
- Callaway, R., Reinhart, K., Moore, G., & Moore, D. (2002). *Epiphyte host preferences and host traits: mechanisms for species specific interactions*. 221–230.
- Carroll, G. (1995). Forest endophytes. *Pattern and Process*, 73.
- Chavez, H. (2014). Propagación in vitro de semillas de Orquídeas mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a4.pdf>
- Cueva, A., González, Y., Pridgeon, A., & Suarez, J. (2009). In vitro germination and somatic embryogenesis induction in *Cyrtorchillum loxense*, an endemic, vulnerable orchid from Ecuador. Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids.



- Damon, A., Aguilar-Guerrero, Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, chiapas, méxico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 195–203.
- Dearnarley, D. W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Journal Mycorrhiza*, 17(6), 475–486.
- Dearnarley, J. D., & Bougoure, J. . (2010). Isotopic and molecular evidence for saprotrophic Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoides*. *Fungal Ecol*, 3.
- Dearnarley, J. D., & Le Brocque, A. F. (2006). Molecular identification of the primary root fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (Yellow hyacinth orchid). *Aust J Bot*, 54.
- Dickie, I. A., & FitzJohn, R. G. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi. a methods review. *Mycorrhiza*, 17.
- Diverso, E. . (2011). El reino de las orquídeas. Retrieved February 4, 2008, from <https://ecuadormegadiverso.wordpress.com/2011/05/23/el-reino-de-las-orquídeas/>
- Dumbrell, A. J., Ashton, P. D., Aziz, N., Feng, G., Nelson, N., Dytham, C., & Helgason, T. (2011). Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parralled pyrosequencing. *New Phytol*2, 190.
- Esposito, F., Jacquemyn, H., Waud, M., & Tyteca, D. (2016). Mycorrhizal Fungal Diversity and Community Composition in two closely Related *Platanthera* (Orchidaceae) Species. (*U.o. Serena Aceto, Ed.*). Retrieved from doi:10.1371/journal.pone.0164108
- Faria, D., Dias, A., Melo, I., & Carvalho costa, F. (2013). Endophytic bacteria isolated form orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and*

- Biotechnology, 29(2), 217–221.
- Fernández, R., & Le, S. (1987). *DGGE*: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. México, s.e., 149-174.
- Flores, G., Legaria, J., Gil, L., & Colinas, M. (2008). Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3), 347–353.
- Galdiano, J., Pedrinho, E., Castellane, T., & Lemos, E. (2011). Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 35(3), 729–737.
- Galeas, C., Aguirre, Z., Navarro, G., Ferreira, W., Cornejo, X., Mogollón, H., ... Toasa, G. (2010). *Propuesta metodológica para la representación cartográfica de los ecosistemas del Ecuador continental*.
- Gaona, J., Garza, Y., Rodríguez, J., & Martínez, G. (2012). Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. *CienciaCierta.Uadec.Mex*29.
- García, F. R. (2003). Concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrízicos en dos cultivares de chile (*Capsicum annum* L.). *Roman García. Pdf*. Retrieved from [http://digeset.ucol.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Francisco](http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Francisco)
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*.
- Garibay-Orijel, R., Oyama, K., & A, D. . (2011). Hongos endófitos de la orquídea epífita *Laelia speciosa*. *Lankesteriana*, 11. Retrieved from

<http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/viewFile/18301/18490>

- Gradstein, S. (2008). Epiphytes of tropical montane forests-impact of deforestation and climate change. *Biodiversity and Ecology Series*, (2), 51–65.
- Guzmán, A., & Moreno, J. (2014). Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos micorrizicos de orquídeas epifitas en bosques montano del Sur del Ecuador (tesis). *Universidad Del Azuay*. Retrieved from <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4239/1/10798.pdf>
- Guzmán Salinas, N. a, & Moreno Coronado, B. J. (2014). efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos micorrizicos de orquídeas epifitas en bosques montano altos del sur del Ecuador. Cuenca. *Universidad Del Azuay*.
- Honrubia, M. (2009). las micorrizas: una relación planta-hongo que dura mas de 400 millones de años. *Anuales Del Jardín Botánico de Madrid*. Retrieved from doi:10.3989/ajbm.2226
- Howeler, M., Ghiorse, W., & Walker, L. (2003). A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. In 54 (pp. 37–45).
- Hyde, K., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163–173. Retrieved from <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-9.pdf>
- Jadán, O., Cedillo, H., Zea, P., Quichimbo, P., Peralta, A., & Vaca, C. (2016). Relación entre la deforestación y variables topográficas en un contexto agrícola ganadero, cantón Cuenca. *Cuenca: Bosques Latitud Cero*.
- Jiménez, M. (2014). Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/26863213>

Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador.

*Monographs in Systematic Botany Form the Missouri Botanical Garden*, (75), 1–1181.

Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., & Selosse, M. A. (2005).

Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol*, 166.

Kleinsy, B., Talyor, D., & Watson, L. (2011). Mycorrhizal specificity in the fully

mycoheterotrophic *Hexaletris Raf.* (Orchidaceae Epidendroideae). *Molecular Ecology*, 20, 1303–1316.

Kristiansen, K. A., Taylor, D. L., Kjoller, R., Rasmussen, H. N., & Rosendahl, S. (2001).

Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *MolEcol*, 10.

Kuisiene, N., Raugalas, J., Stuknyte, M., & Chitavichius, D. (2007). Identification of the

genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, 277.

Lakon, G. (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germination

capacity of the seed. *Plant Physiol*, (24), 389–394.

Lauran, V., Thien, N., Khien, D., & Nhut, D. (2006). In vitro germination capacity and plant

recovery of some native and rare orchids. *Proceeding of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*.

Leake, J. R. (1994). the biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytol*,

127.

- Leake, J. R. (2004). Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Opin Plant Biol*, 7.
- Lievens, B., van kerchhove, S., Juste, A., Cammue, B. P., Honnay, O., & Jacquemyn, H. (2010). From extensive clone libraries to comprehensive DNA arrays for the efficient and simultaneous detection and identification of orchid mycorrhizal fungi. *J Microbiol Methods*, 80.
- Lodge, D. J., & Cantrell, S. (1995). Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. *Can. J. Bot*, 73(1), 11.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). Brock: biología de los microorganismos. In *Pearso Addison Wesley* (Vol. 12). Madrid.
- Martínez-Meléndez, N., Pérez-Farrera, M. A., & Flores-Palacios, A. (2008). Estratificación vertical y preferencia de hospedero de las epífitas vasculares de un bosque nublado de Chiapas, México. (*H.E. Matuda, Ed.*), 56(4), 2069–2086.
- Martos, F., Dulormne, M., Paillet, T., Bonfante, P., Faccio, A., Fournel, J., & Selosse, M. A. (2009). Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytol*, 184.
- Mayo Mosqueda, A., Cázares Camero, J., de la Cruz Lázaro, E., & Flores Hernández, A. (2010). Germinación in vitro de semillas y desarrollo de pántulas de Orquídeas silvestres de Tabasco. *Universidad Autónoma de Tabasco*.
- McCormick, M. ., Lee Taylor, D., Juhaszova, K., Burnett, R. ., Whigham, D. ., & O'Neill, J. P. (2012). Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology*, 21(6), 11–23. Retrieved from <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05468.x>

- McCormick, M., Whigham, D., & O'Neill, J. (2004). *Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids*.
- Mitchell, R. (1989). Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman*, (11), 152–169.
- Molina Cabrera, J. C. (2012). “Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Comporettia speciosa* Rchb.f.” *Universidad de Cuenca*, 171.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3).
- Narrea, M. (2006). *agar dextrosa papa*. Retrieved from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a25v45.pdf>
- Ohki, T., Masuya, H., Yonezawa, M., Usuki, F., Narisawa, K., & Hashiba, T. (2002). Colonization process of the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* in roots of chinese cabbage. *Mycoscience*, 43(2), 191–194. Retrieved from <http://doi.org/10.1007/s10267-002-0020-0>
- Otero, J. ., Mosquera, A. ., & Flanagan, N. . (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Otero Ospina, J. B. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58.
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., & Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity t different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, 10(94).

- Paun, O., Bateman, R., Fay, M., Hedrén, M., Civeyrel, L., & Chase, M. (2010). *Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (Dactylorhiza: Orchidaceae)*.
- Petterson, R., & Massicotte, H. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany*.
- Pla, L. (2006). *BIODIVERSIDAD : inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza*. 31(Asociación Interciencia), 583–590. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911906>
- Rasmussen, H. N. (1995). Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Rastogi, G., & Sani, R. (2011). Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. *Microbes and Microbial Technology*. Springer, 29–57.
- Read, D. J. (1999). Mycorrhiza. In *en The State of the art. En . Mycorrhiza 2nd*(A. Varma y B. Hock, eds). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Redman, R. S. (2002). Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science*, 298(5589), 1581–1581. Retrieved from <http://doi.org/10.1126/science.1072191>
- Rey, P., Leucart, S., Désilets, H., Bélanger, R., Larue, P., & Tirilly, Y. (2001). Production of indole-3-acetic acid and tryptophol by Pythium group F: possible role in pathogenesis. *EurJPlant Pathol*, 895–904.
- Rubini, M. ., Silvia-Ribeiro, R. ., Pomella, A. W., Maki, C. ., Araújo, W. ., Dos Santos, D. R., & Azevedo, J. . (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao

- (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1. Retrieved from <http://doi.org/10.7150/ijbs.1.24>
- Rueda, D. (2004). Módulo Biotecnología aplicada. In *Universidad Xamorano, carrera de ciencia y producción Agropecuaria*. Chile.
- Salazar, M. (2017). Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas (tesis de maestría ). 49.
- Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M., & Macías-Rubalcava, M. (2013). Endophytic fungi: a potential source of bioactive secondary metabolites and their application in agriculture and medicine. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Schulz, B. (2006). Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes. Retrieved from [http://sci-hub.io/10.1007/3-540-33526-9\\_15](http://sci-hub.io/10.1007/3-540-33526-9_15)
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A.-K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996–1004. Retrieved from <http://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2005). Growing Orchids from seeds. In E. M. P. Pr (Ed.), *Royal Botanic Gardens, Kew* (1 ra Edici, p. 83). Italia.
- Selosse, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Resour*, 9.
- Shaw, D. (2004). Vertical organization of canopy biota. In *Elselvier Academic San Diego*.



California, EEUU.

- Shin-Ichi, F., Yasuko, S., Nakaguchi, S., & Takuma, H. (2001). Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *American Society for Microbiology*, 39(10), 3617–3622. Retrieved from 10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. *Elsevier, New York*.
- Smith, S., & Read, D. (2010). Mycorrhizal symbiosis. *Academic Press*.
- Storm, P. F. (1985). Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4).
- Swarts, N. D., Sinclair, E. A., Francis, A., & Dixon, K. W. (2010). Ecological specialisation in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Mol Ecol*, 19.
- TER STEEGE, H., & CORNELISSEN, J. (1989). Distribution and ecology of vascular epiphytes in lowland rain forest of Guyana. 21, 331–339.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Klimova, S., Shestakov, A., Botina, S., & Netrusov, A. (2007). Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188(6), 655–664.
- Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez, S., & Jorgensen, P. (2000). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. *Pontificia Universidad Católica Del Ecuador*.
- Weber, R. W. (2001). Teaching techniques for mycology: 14. Mycorrhizal infection of orchid seedlings in the laboratory. *Kaiserslautern, Germany: MYCOLOGIST*. Retrieved from

doi:[https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(01\)80077-X](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(01)80077-X)

- Wemheuer, B., Thomas, T., & Wemheuer, F. (2019). Fungal Endophyte Communities of Three Agricultural Important Grass Species Differ in Their Response Towards Management Regimes. *Microorganisms*, 7(2), 37.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7020037>
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic, San Diego*.
- Whitman, W., Coleman, D., & Wiebe, W. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583.
- Wilkinson, K., Dixon, K., & Sivasithamparam, K. (1989). Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids.
- Yoder, J. ., Zettler, L. W., & Stewart, S. L. (2000). Water requirements of terrestrial and epiphytic orchids seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Sci*.
- Zettler, L. W., Corey, L. ., Jacks, A. L., Gruender, L. T., & Lopéz, A. M. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tullasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in south Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*, Ed.
- Zettler, L. W., Poulter, S. ., & McDonald, K. . (2007). Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with mycorrhizal fungus. *HortScience*, 42(1),



135–139.

Zhu, G. S., Yu, Z. N., Gui, Y., & Liu, Z. Y. (2008). A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Divers*, 33.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Recolección de raíces y semillas de oqrquídeas de las especies de *Elleanthus amethystinoides* y *Cyrtochillum Gyriferum*, en los bosques de Lluchicarrumi (Gañadel) y Campanarumi (Gañadel).

Recolección de raíces guiada por directora de tesis Bióloga Denisse Peña y por grupo de trabajo Ing. Oswaldo Jadán y Ing. Hugo Cedillo. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



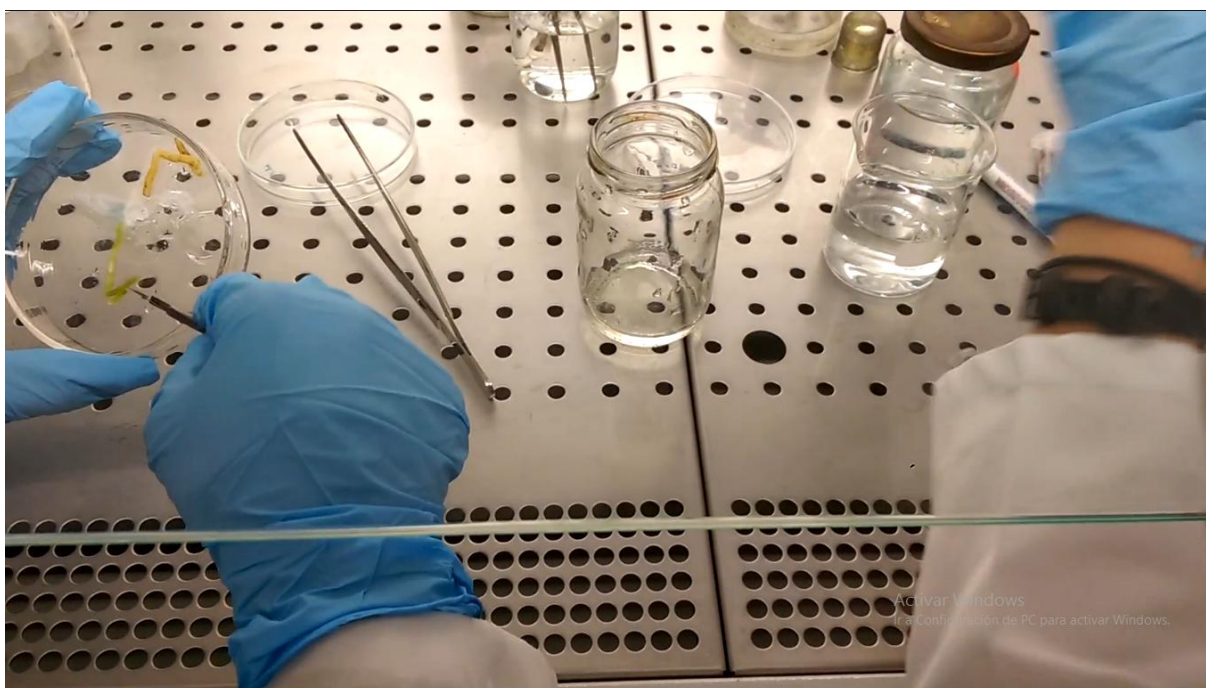




**Anexo 2.** Desinfección de raíces de orquídeas de *Elleanthus amethystiniodes* y *Cyrtorchillum Gyriferum*.

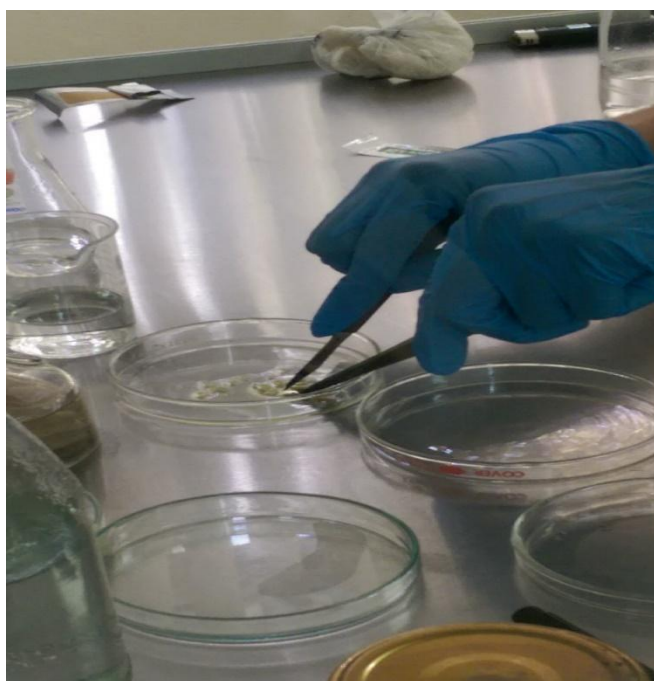


**Imagen10.** Desinfección de raíces de orquídeas recolectadas siguiendo el protocolo establecido. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



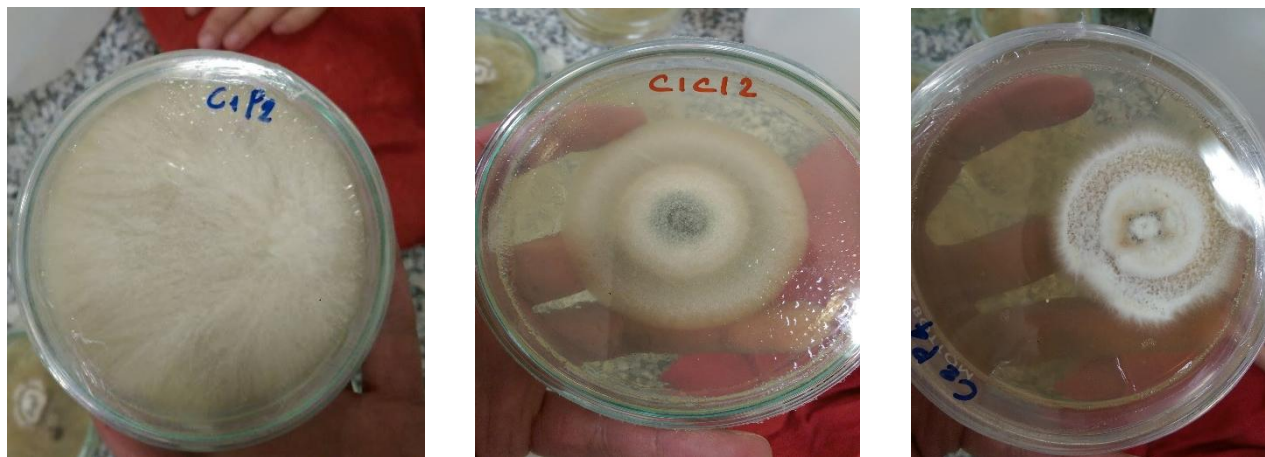
**Imagen11.** Desinfección de raíces de orquídeas recolectadas siguiendo el protocolo establecido. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Anexo 3.** Aislamiento de los hongos Endófitos de las raíces de orquídeas colectadas.

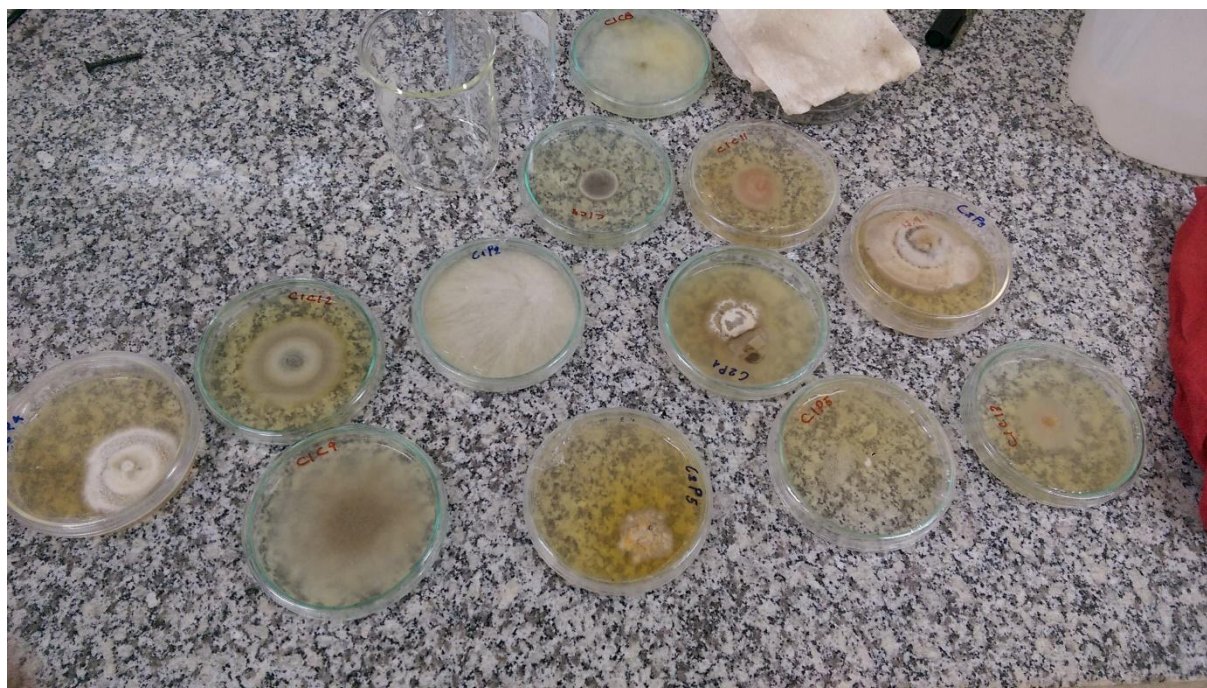




**Imagen 12.** Siembra de raíces de orquídeas en Medio FMI para la obtención de hongos endófitos siguiendo el protocolo establecido en laboratorio. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



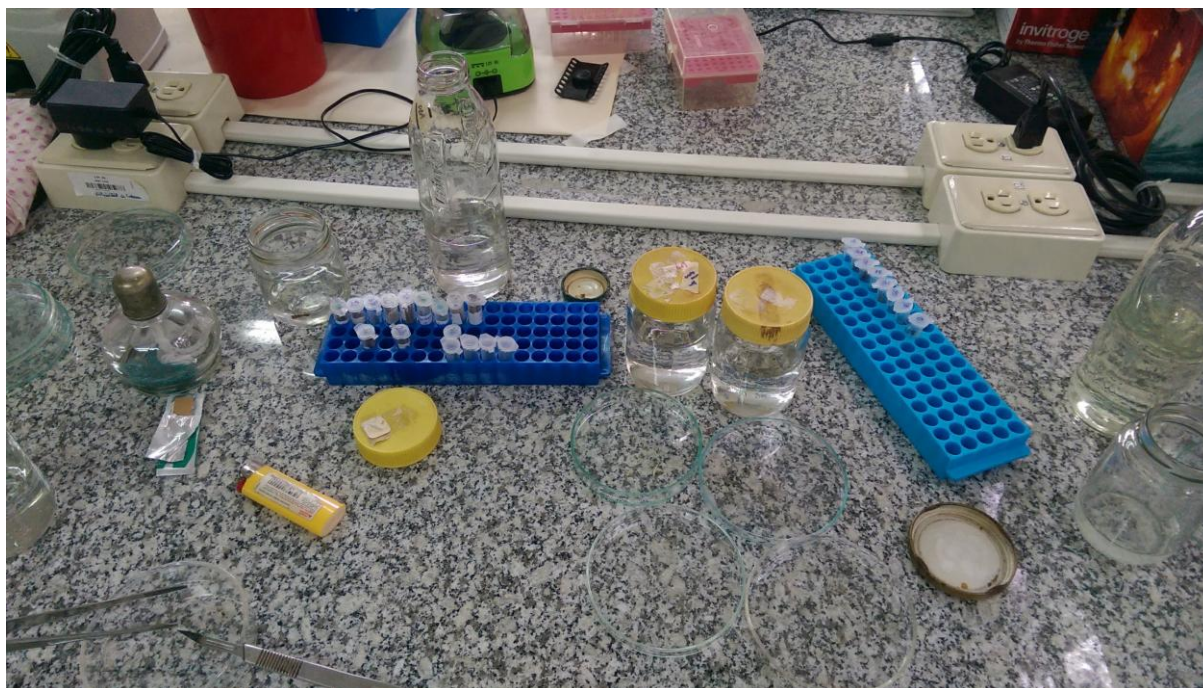
**Imagen 13.** Hongos obtenidos del aislamiento de las raíces de orquídeas de las especies *Elleanthus amethystiniodes* y *Cyrtorchillum Gyriferum* sembradas en Medio FMI siguiendo el protocolo establecido en laboratorio. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



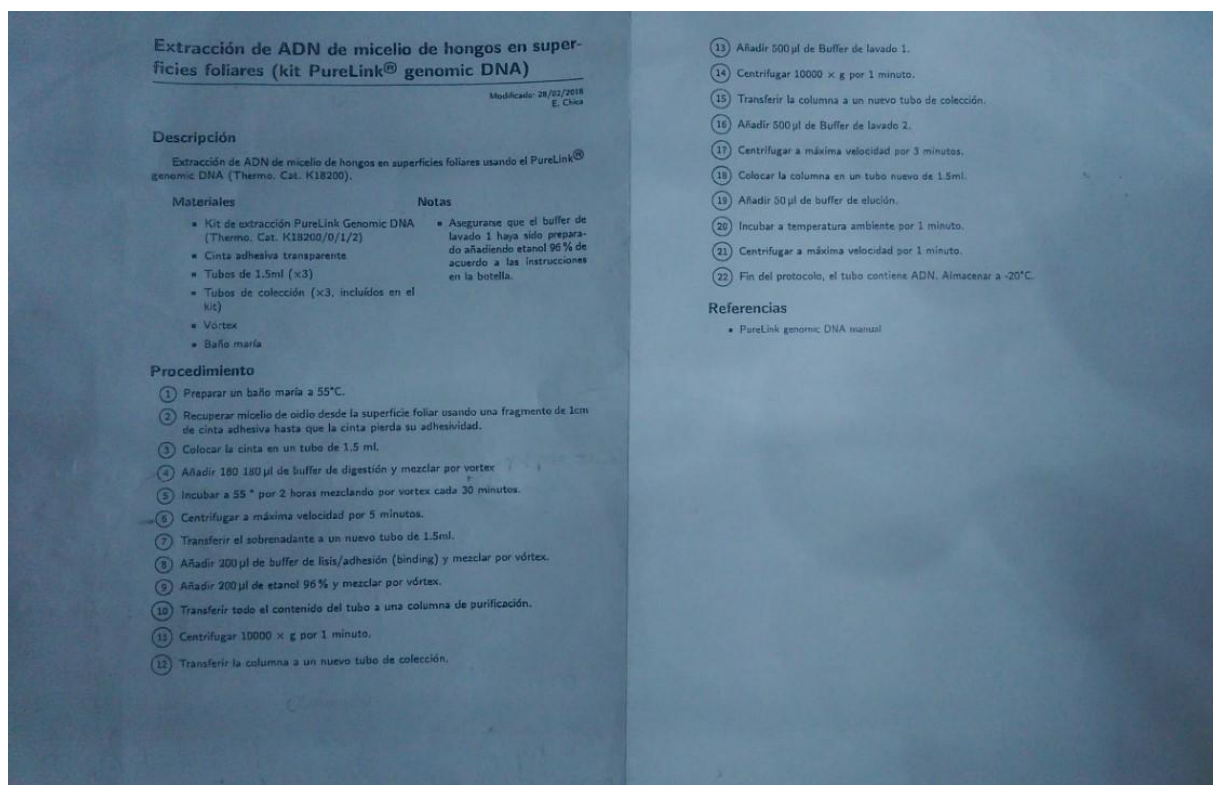
**Imagen 14.** Hongos obtenidos del aislamiento de las raíces de orquídeas de las especies *Elleanthus amethystiniodes* y *Cyrtorchillum Gyriferum* sembradas en Medio FMI siguiendo el protocolo establecido en laboratorio. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



#### Anexo 4. Extracción de ADN Metagenómica de las muestras de hongos

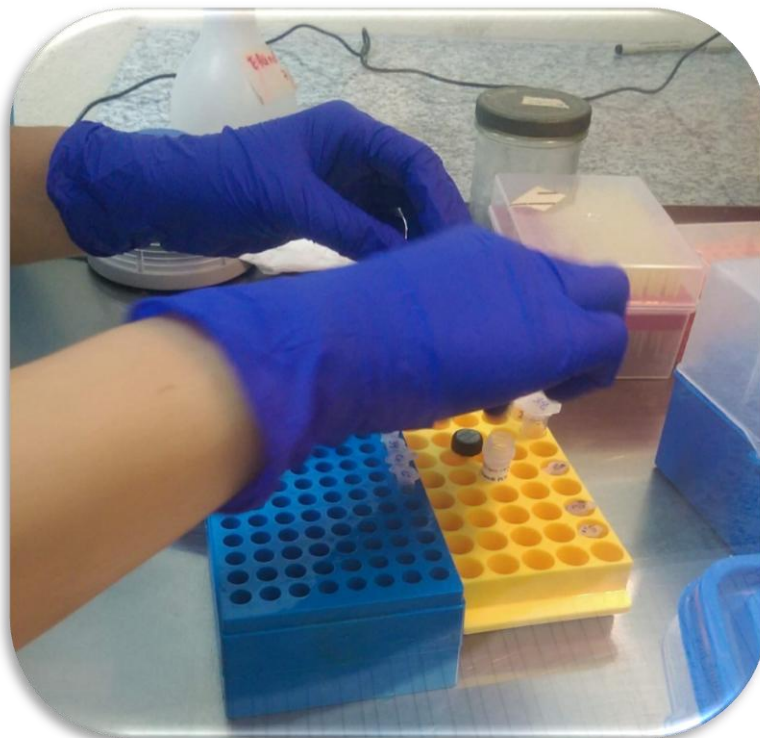


**Imagen 15.** Extracción de ADN de las muestras de hongos aislados de las raíces de orquídeas siguiendo el protocolo establecido. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



**Imagen 16.** Protocolo de extracción de ADN. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



**Anexo 5. PCR de las muestras fúngicas.**

**Imagen 17.** Amplificación de marcadores moleculares fúngicos mediante reacción PCR. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo

**Anexo 6. Secuencias**

```
>181109-030_A13_49_ITS1.ab1      831
TCTTACGAAGTTTGATAGTCGGGCGCCACATCAACCCGTGACTACCTAAC
ACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTAC
TGAACCTTCATGCCTGATAGTGATGCACTCTGAGTCTGAATATAAAATCAG
TCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCCATGAAGAACGC
AGCGAAGTGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCTAG
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTGTCGTC
CCCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCATCGGCGGCACCGTGTCCGGTCCTC
GAACGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTATGGGCGGGCGGGCGCAAC
CTACTCTCCAACCTTTTTCTTACGTTGACCTCAGAACAGGTAGGGATAC
CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAACCTTTGGATTTTGAT
CTCAAATCAGGTACGACTACCCGCTGAACTTAAGCCTATCAATAAGCGGA
GGAACCTTCTTCCACCTGGATGGTTCTAACCATCCAGCCTGCCGGCTAAC
ACATGCAGGGAAAATTCTTTCTTACATCTTTCAAAAAAAAAAATTGTTTT
GCTCTATTCTTTGTCCTGTCCTCTTTTGTCTTTTCTTTTCTTCTCACCCTC
CCGTGAACCTAAGGATTATTTTATCTCCATCCCCCCTCCCCCCTCCT
ACAACCATCCCCCAGCCCCCATCTAACA
```

**Figura 9.** Resultados de la secuenciación por parte de MacroGen. Base de cadena de nucleótidos del hongo1. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo

Ascomycota sp. 3/4/2002 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KP284431.1](#) Length: 536 Number of Matches: 1

Range 1: 17 to 536 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
841 bits(455)	0.0	499/520(96%)	4/520(0%)	Plus/Plus
Query 19	TCGGGCG-CCACAT-CAACCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCT	76		
Sbjct 17	TCGGGCGCCACCTCCACCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCT	76		
Query 77	CGGGGGCGAGCCCGGGGACTACTGAACCTTCATGCCTGATAGTGACCTCTGAGTCT	136		
Sbjct 77	CGGGGGCGAGCCCGGGGACTACTGAACCTTCATGCCTGAGAGTGATGACCTCTGAGTCT	136		
Query 137	GAATATAAAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCGGGCATCCATGAAGA	196		
Sbjct 137	GAATATAAAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCGGGCATCCATGAAGA	196		
Query 197	ACGCAGCGAAGTGGGATAAGTAATGTAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCTAGTCTTTG	256		
Sbjct 197	ACGCAGCGAAGTGGGATAAGTAATGTAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCTAGTCTTTG	256		
Query 257	AACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC	316		
Sbjct 257	AACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC	316		
Query 317	CATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTCCTCCCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCA	376		
Sbjct 317	CATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTCCTCCCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCA	376		
Query 377	TCGGCGCACCGTGTCCGGCTCTCGAACGATAGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTATGGG	436		
Sbjct 377	TCGGCGCACCGTGTCCGGCTCTCGAACGATAGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTATGGG	436		
Query 437	CGGGCGGGCGCAA-CCTAC-TCTCCAACCTTTTCTTCACGTTGACCTCAGAACAGGTAG	494		
Sbjct 437	CGGGCGGGCGCCAGCGGACGCTCCCAACCTTTTCTTCACGTTGACCTCAGAACAGGTAG	496		
Query 495	GGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	534		
Sbjct 497	GGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	536		

**Figura 10.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 1 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada.

Fuente: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP284431.1?report=genbank&log\\$=nucloptop&blast\\_rank=3&RID=G34HJWPF015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP284431.1?report=genbank&log$=nucloptop&blast_rank=3&RID=G34HJWPF015)

```
>181109-030_E13_51_ITS1.ab1      913
TGGGGTTCGTGAGTCGAGTGCCCTGCTTACTGCGCGCCACCACCTGTAC
TCCTGTGTGCTGTGACCGGAACCTTGCTTTGGTTTGGCCTACAGATAG
GATGGGCCAGAGGTTTAACAGAACACAATTTAATTATATTTACAGTTAGT
CAAATTTTGAATTAATCTTCAAAACTTTCAACGACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTATTACGAATTGCGGA
TTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGACCCACATTGCGCCCTCTGGTATTC
CAGAGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGTTT
GGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGGACTGGGCGTTTGCTTGAAAAGTATT
GGCATGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTATTAGGGTT
ATCCAACCTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGAAGGCCCG
GCCTTACAACAACCAAACAAGTTTGACCTCAGATCAGTAGGAATACCCGC
TGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAACTTACTCCTGTATCAGCG
GAGGGATGAACGTTCGGCAACAACGACCCAGCTTTTTTTTAGCCTGA
ATACGAATTTGGGGTGGGCAAAAAATCGGTCGTTCCAACTTTTTAAAAA
AACAATTTGTGTGGTTTAGGGTGGTCCGATGTCGAAATATTTCAAATTT
TACCCTGACCCTCGGCTTTTTCGTTATAAAAAAACCCCAACCGCCGCC
ACAAAAAACCGCAGATCATGCGACACTAACGATTCCGCCCATATGCCCT
CCCGGGAAAAAAGCCCCCCTTGGGGGGTTTTTTTTTTTAAACCCCCG
GTTCTGTTTTGT
```

**Figura 11.** Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 3 y hongo 3(1). Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Meyerozyma guilliermondii strain JYC2600 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [MK044079.1](#) Length: 750 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 560		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
870 bits(471)	0.0	531/560(95%)	4/560(0%)	Plus/Plus			
Query 25	GCTTACTGCGCCGCCACCACTGTACTC-CTGTGTCGTGTGA-CCGGAACCTTCTGCTTT	82					
Sbjct 2	GCTTACTGCGCGGCAAAACCT-TACACACAGTGTCTTTTGATACAGAACTCTTGCTTT	60					
Query 83	GGTTTGGCCTACAGATAGGATGGGCCAGAGGTTTAAACAGAAACAATTTAATTATATTTA	142					
Sbjct 61	GGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTTAATTATATTTA	120					
Query 143	CAGTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACGACGGATCTCTTGGTCTTCG	202					
Sbjct 121	CAGTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACGACGGATCTCTTGGTCTTCG	180					
Query 203	CATCGATGAAGAACGACGCAAAATGCGATAAGTATTACGAATTGCGGATTTTCGTGAATC	262					
Sbjct 181	CATCGATGAAGAACGACGCAAAATGCGATAAGTATTACGAATTGCGGATTTTCGTGAATC	240					
Query 263	ATCGAATCTTTGACCCCACTTGGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCTGTTGAGC	322					
Sbjct 241	ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCTGTTGAGC	300					
Query 323	GTCAATTTCTCTCTCAAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGACTACTTTAGTCGGACTGGC	382					
Sbjct 301	GTCAATTTCTCTCTCAAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGACTACTTTAGTCGGACTAGC	360					
Query 383	GTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTA	442					
Sbjct 361	GTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTA	420					
Query 443	TTAGGGTTATCAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGAAGGCCCGGC	502					
Sbjct 421	TTAGGGTTATCAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTGGCCCGGC	480					
Query 503	CTTACAACAACCAACAAGTTTGAACCTCAGATCA-GTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGC	561					
Sbjct 481	CTTACAACAACCAACAAGTTTGAACCTCAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGC	540					
Query 562	ATATCAATAAGCGGAGGAAA	581					
Sbjct 541	ATATCAATAAGCGGAGGAAA	560					

[Questions!](#)

**Figura 12.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 3 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Debaryomyces sp. R99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [JQ665430.1](#) Length: 711 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 563		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
869 bits(470)	0.0	531/560(95%)	5/560(0%)	Plus/Plus	
Query	25	GCTTACTGCGCGGCCACCACTGTACTC-CTGTGTGTTGTGA-CCGGAACCTTGTCTT			82
Sbjct	6	GCTTACTGCGCGGCGAC-ACCT-TACACACAGTGTCTTTTGATACAGAACTCTTGCTTT			63
Query	83	GGTTTGGCCTACAGATAGGATGGGCCAGAGGTTTAAACAGAAACAATTTAATTATTTA			142
Sbjct	64	GGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACAATTTAATTATTTTA			123
Query	143	CAGTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACGACGGATCTCTTGGTCTCG			202
Sbjct	124	CAGTTAGTCAACTTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACCAAGGATCTCTTGGTCTCG			183
Query	203	CATCGATGAAGAACGACGCAAAATGCGATAAGTATTACGAATTGCGGATTTTCGTGAATC			262
Sbjct	184	CATCGATGAAGAACGACGCAAAATGCGATAAGTAAATTAAGTTCGGAATTTTCGTGAATC			243
Query	263	ATCGAATCTTTGACCCCACTTGGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCTGTTGAGC			322
Sbjct	244	ATCGAATCTTTGACCGCACTTGGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCTGTTGAGC			303
Query	323	GTCAATTTCTCTCTCAAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATCTCTTAGTCGGACTGGC			382
Sbjct	304	GTCAATTTCTCTCTCAAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATCTCTTAGTCGGACTGGC			363
Query	383	GTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTA			442
Sbjct	364	GTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTA			423
Query	443	TTAGGGTTATCAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGAAGGCCCGGC			502
Sbjct	424	TTAGGGTTATCAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTGGCCCGGC			483
Query	503	CTTACAACAACCAACAAGTTTGAACCTCAGATCA-GTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGC			561
Sbjct	484	CTTACAACAACCAACAAGTTTGAACCTCAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGC			543
Query	562	ATATCAATAAGCGGAGGAAA	581		
Sbjct	544	ATATCAATAAGCGGAGGAAA	563		

**Figura 13.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 3 (1) por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

```
>181109-030_013_56_ITS1.ab1      621
ATGTTTTCGTCGATTCTTTCTCGAAGATCTTTTCTTTGTGCTGGCTTT
GACCGTATGTAATTTTGGGACTTAAACATGGTAGCCTTACGGTTGCCGGT
CCCCAAAAACAATATATCATCCTTATGAAAACCTTCCGGACCACCTAACCA
TGGATTTATTATCCGGTTTAAACCACCTTCCACCACCGAACCCCTGGTTC
CCCCCTCCATTAAAAACCCACCAAATTCCATTCTTATGGTAATTTGCA
AAATCCATGGATCCACCAAACCTTTAACCCCTTTGCCTCCCTGGTAAT
CCCAAGAATAATCCCGGTTCCATAACCTTAACCTCCCCCTCTAACCT
TTGGCTAAAAGGGGAAATTGGAATCCCCCAATTTCTTTATCCGCCCTC
CCTAAATGGTACTCTGGCCGGTTCCTCCTCCACCATTGGCCCTATTA
TTTTTAACCTTTGGCCAATCCTTTGCCTCCTTTTCTCCGGAACCATCC
TGAATATCCAAAAACCCCTTTCAACCTTTATCCTGAATCCAGGAAGGC
CTCCCCCTAACCTTAACCTAACCTAACGCGAAGAAAAATAATCTTC
CCAAAGCTTTTCTTCCCCC
```

**Figura 14.** Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 8.  
Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Fungal sp. 3.12.4D 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KM068430.1](#) Length: 644 Number of Matches: 1

Range 1: 69 to 623 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
254 bits(137)	4e-63	427/566(75%)	24/566(4%)	Plus/Plus		
Query 15	TCCTTC-CTCG-AAGATCTTTTCTTTGTGCTGGCTTTGACCGTATGTAATTTGGGACT	72				
Sbjct 69	TCCTTCACCTCGAAGATCTTTTCTTTGTGCTGGCTTTGACCGTATGTAATTTGGGACT	128				
Query 73	TAAACATGGTAGCCTTACGGTTGCCGGTCCAAAAACAATATCATCCTTATGAAAAC	132				
Sbjct 129	TAAACATGGTAGCCTTACGGTTGCCGGTCCAAAAACAATATCATCCTTATGAAAAC	187				
Query 133	TTCCGGACCACTAACCATGGATTTT-ATTATCCGGTTTAAACCACCTTCCACCACGAAC	191				
Sbjct 188	TTACTGAACAACCTAAACATGATTTTAAATATCTGTTTAAACAACCTTCAACAACGGAT	247				
Query 192	CCC-TGGTTCCCCCTCCATTAAAAACCCACCAAATTCATTCTTATGGTAATTTGCA	250				
Sbjct 248	CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATACGTAATGTGAATT-GCA	306				
Query 251	AAATCCA-TGGATCCACCAAACCTTTT-AACCCCTTTTGC-CTCCCTGGTAATCCCAAGA	307				
Sbjct 307	GAATTCAGTGAATC-ATCGAATCTTTGAACGACATT-GCACTCTTGGTATTCGGAGGA	364				
Query 308	ATAATCCCGGTTCCA-TAACCTAACCTTCCCCCTCTAACCTTTGGCCTAAAAGGGGA	366				
Sbjct 365	GTA-TGCCTGTTTCAATATCATGAGCACTCTACAC-CTAACCTTTGGGTATGATGTGG	422				
Query 367	AATTGGAATCCCCCAATTTCTTTT-TCCGCCCTCCCTAAATGGTA-CTCCTGGCCGGTT	424				
Sbjct 423	AATTGGGATGCGCCGATTTTCATTAGTCGGCACTCCTAAATG-TAGCTCTTGGCTGTTT	481				
Query 425	CCCTCCTCCACCA-TTGGCCCTATTATTTTAACTTTGGCCAATCCTTTGCCTCCTTTT	483				
Sbjct 482	CC-TACTACAGCAGTTTGG-CCTAATAGTTTGAATTTTGTCAAATCTTTGGCTACATTT	539				
Query 484	CCTCCGGAACCA-TCCTGAATATTCCA-AAAAACCTTTCAACCTTTATCCTGAATC	541				
Sbjct 540	GCTTCTGGAAATCAGTCTTGA-TAATACAGAAACCTATTCAAACCTTTGATC-TGAAT	597				
Query 542	CAGGAAGGCTCCCCCTAACCTTAA	567				
Sbjct 598	CAGGTAGGCTACCCGCTGAACCTAA	623				

**Figura 15.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 8 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



```
>181109-030_A15_57_ITS1.ab1      867
ACTGGTTCGTCGGTCGTGCTCGGGGCCACCTCCCACCCGTGACTAC
CTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGG
ACTACTGAACCTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTCAATATAAA
ATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG
AACGCAGTCGAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGC
CTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCG
TCGTCCCCCCCCGGGGGACGGGGCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGCCG
GGCCTCCAACGTATGGGGCTTTGGCACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGG
GCGCCACCCAACCTCCAACCCCTTTCTCAGGGTGACCTCCGAACAGGG
AGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGGCGGAAGAAAGCCTTT
TTGTTTCCATTCTGATCTTAGTCCCACCTTGTGATAGGATCCTCATTGTTG
CTCACCTCTTCTTCTCCTGGAGACTGGCTCTATCCATCCAGCACGCCTA
CCTTCACAGGCAGAAAAACCTTCTTCCACCCCTACTTCTTATACAAAAA
CTAATTTGGTACCATACTATTTCTGCCCTTACATAAGAATAGCTCTTC
TCTTACCCTATGCGTCAGGGTGACCATTTTCTTCTTCCACCCCTACCCA
CTAATATCACATCATCTCATGCGGCAATGTGCCCAACGAACCTCTCACAC
ACATTCAATGAGTTTAT
```

**Figura 16.** Resultados de la secuenciación por parte de MacroGen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 9.  
Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Ascomycota sp. 3/5/2002 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: KP284432.1 Length: 536 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 536 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Next Match</a> <a href="#">Previous Match</a>				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
859 bits(465)	0.0	511/533(96%)	4/533(0%)	Plus/Plus
Query 13	GTCTGCTGCTCGGGCG-CCACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGG	71		
Sbjct 6	GTCTGCTGCTCGGGCGCCACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGG	65		
Query 72	GGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCGGGGACTGAACTTCATGCTGAGAGTGATGCA	131		
Sbjct 66	GGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCGGGGACTGAACTTCATGCTGAGAGTGATGCA	125		
Query 132	GTCTGAGTCTCAATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCA	191		
Sbjct 126	GTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCA	185		
Query 192	TCGATGAAGAACGAGTCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCA	251		
Sbjct 186	TCGATGAAGAACGAGTCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCA	244		
Query 252	TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCG	311		
Sbjct 245	TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCG	304		
Query 312	TCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGGGTGCTCGTCCCCCCCCGGGGGACGGG	371		
Sbjct 305	TCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGGGTGCTCGTCCCCCCCCGGGGGACGGG	364		
Query 372	GCCGAAAGGCAGCGGGCGCACCGTGTCCGGGCTCCAACGTATGGGGCTTTGACACCCGC	431		
Sbjct 365	CCCGAAAGGCAGCGGGCGCACCGTGTCCGGGCTCCAACGTATGGGGCTTTGACACCCGC	424		
Query 432	TCGATTTAGGGCCGGCGGGCGCCACCACTTC-CCAACCTTTTCTCAGGGTGACCT	490		
Sbjct 425	TCGA-TTAGGGCCGGCGGGCGCCACGACGTCTCAACCATTTTCTCAGGTTGACCT	483		
Query 491	CCGAACAGGGAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGGCGGAAGAA	543		
Sbjct 484	CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGGCGGAAGAA	536		

**Figura 17.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 9 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

```
>181109-030_C15_58_ITS1.ab1      829
TTTGGGGGTTGCGGGGGGGTCTGGCCGGGCGCGCTGCTCCCCCCTGACT
AACTTTGCTGTTGCGTCGGCGGGGAGCCCCACGGGGGGCCAGACGCCGGG
GACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCAGAATAAAA
AATCAGACAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCCGGCCCAATGAA
GAACTTTTTTTTACTGCCCAATAAATGTGAATTGGTAAATTCAGTGAATC
ATCGAGGCTTTGAACGCGCATTGGGCCCTTGGTATTTTGGGGGGGTTGT
TTGGCCCATCGAAATTGCTGCCCATCAATCGCGGCTTGTGTGTTGAATCA
TCATCCACCCCCGGGGGAGGGGACTAAATGTCGCGGAGGGGACGGGTTCT
GTCCCCCAGCCTATGGGGATTGGCACCCGCTCTTTAAGGGCGGGCGGG
GTGCCCGCGAATTTTTTGAATTTTTTTTTTTTGGTTAACGGGGAAGGGGA
GGGATTCCCGGTGAAACTTATTTTTTTCATTAGGGGAAGAAAACCGTTTT
GATGCGCTTATATCGTTACCGCATGAAGGGTCAAACATGGTTTACCTCAT
TATACCTTCTAATGAAAGTTGCTTCCACCACCGTGCAAACAAAAAAGGA
AGGAAAAAGATGATCCCTCGCCCCCAACTCCAAAAAATTGGCGTGGCTCC
TTAATTTGCTGACTTTTATTATTGCTTTGTTTTTCCCTCATCCTCCCGT
AAGGCAGAGAAGTTTATTCCACCACCCCCCCCCCCCCCCCCCAACAAC
CCAGCCCACCAGCCGCGTAATAAAATAAA
```

**Figura 18.** Resultados de la secuenciación por parte de MacroGen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 10.  
Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Fungal sp. CB30\_L3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [EU554616.1](#) Length: 525 Number of Matches: 1

Range 1: 37 to 476 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					<a href="#">Next Match</a> <a href="#">Previous Match</a>	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
333 bits(180)	7e-87	355/441(80%)	6/441(1%)	Plus/Plus		
Query 25	CCGGGCGCGC-TGCTCCC-CCCCTGACTAACT-TTGCTGTTGCGTCGGCGGGGAGCCCCC	81				
Sbjct 37	CCGGGCGCCCAACCTCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCCC	96				
Query 82	ACGGGGGCGCAGACGCGGGGACTACTGAATTCATGCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTC	141				
Sbjct 97	TCGGGGGCGAGCGCCGGGGACTACTGAATTCATGCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTC	156				
Query 142	AGAATAAAAAATCAGACAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCCGGCCCAATGAAG	201				
Sbjct 157	TGAATATAAAATCAGTCAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCCGGCATCGATGAAG	216				
Query 202	AACtttttttACTGCCCAATAAATGTGAATTGGTAAATTCAGTGAATCATCGAGGCTTT	261				
Sbjct 217	AACGAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT	276				
Query 262	GAACGCGCATTGGGCCCCCTTGGTATTTTGGGGGTTGTTGGCCCATCGAAATGCTGC	321				
Sbjct 277	GAACGCAATTTGGCCCCCTGGCATTCCGGGGGATGCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC	336				
Query 322	CCATCAATCGCGGCTTGTGTGTTGAATCATCCACCCCGGGGAGGGGACTAAATGT	381				
Sbjct 337	CCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTC-CCCCGGGGGACGGGCGGAAAGG	395				
Query 382	C-GCGGAGGGGACGGGTTCTGTCCCCAGGCTATGGGGATTGGCACCCGCTCTTTAAG	440				
Sbjct 396	CAGCGGCGGACCGGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCGATTAG	455				
Query 441	GGCGGGCGGGGTGCC-GCCGA	460				
Sbjct 456	GGCGGGCGGGGCGCAGCGA	476				

**Figura 19.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 10 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

```
>181109-030_E15_59 ITS1.ab1 1209
TTTCTCGTAGTGGTTTTTCGGCGCTTACTGCGCGCGAAAAACCTTACACA
CAGTGTCTTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGG
TTGGGCCAGAGGTTTAACAAAAACAAATTTAATTATTTTACAGTTAGTC
AAATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGACGGAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGAT
TTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTC
AGAGGGCATGCCTGTTTGAAGCGTCTTTCTCTCAAACCCCGGGTTTG
GTATTGAGTGATCTTGTAGTCGGACTAGGCGTTTGGTTGAAAAGTATTG
GCATGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTATTAGGTTTA
TCCAACCTCGTTGAATGGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCG
CCTTACAACAACCAAAAGTTTGACCTCAATCAGGTAGGAATACCCGC
TGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAGGATCATTACAGTATTCTT
TGCAGCGCTTAACGCGCGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTTTG
ATACAAAACCTGGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGCCAAAGGT
TTTACAAAACCAATTTAATTATTTTACGTTTGTAGTCAATTTTGAATTA
TCTTCAAACTTTCAACACGGAACCTGCGTTCTCCATCCATAAAAAACC
CGCGAATGCTATAAGGTAAGTAAATGAAATTGCAATTTTTCGAAACCTCA
ATCTTTGAACGCAATTGGCCCCGGGAATTCAGAGGAATGCCGTTTTA
AGGCTTTTTTCTCTAACCCCGGTTTGGGTATTGAGGGGAAACCTCAGA
TCGGAACAAGCCTTTTGTGTAAGAAAAAATGGGCGGGGGGTAACG
GGGAAAGGGGGGGGGCCACCCAGGGAATAAGGTTTCCCCCCTT
TAAAGGGGGGGGGGGGAAATTTTGGGTTTGTGGGGCCGCCCT
AAAAAAGGGGGGGGGGGGAAATTTTGGGTTTGTGGGGCCGCCCT
AAAAAAGGGGGGGGGGGGAAATTTTGGGTTTGTGGGGCCGCCCT
CCTTTCTAACGGGGGGGAAAAAATCTGTGCGTTTTCCTCCG
GGGCCCCA
```

**Figura 20.** Resultados de la secuenciación por parte de MacroGen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 11.  
Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Meyerozyma guilliermondii isolate 6H1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: KF619546.1 Length: 741 Number of Matches: 3

Range 1: 1 to 740 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
1267 bits(686)	0.0	731/750(97%)	13/750(1%)	Plus/Plus		
Query 28	GCCTTACTGCGCGGAAAAACCTTACACAGTGTCTTTTATACAGAACTCTGCT	79				
Sbjct 1	GCCTTACTGCGCGGAAAAACCTTACACAGTGTCTTTTATACAGAACTCTGCT	68				
Query 80	TTGGTTTGGCTAGAGATAGGTTGGCCAGAGGTTAAACAAACAAATTTAATTTT	139				
Sbjct 61	TTGGTTTGGCTAGAGATAGGTTGGCCAGAGGTTAAACAAACAAATTTAATTTT	120				
Query 140	TACAGTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTCT	199				
Sbjct 121	TACAGTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTCT	180				
Query 200	CGCATGATGAAGAACGACGGAATGCGATAAGTAATGAATGACGATTTTCGTGAA	259				
Sbjct 181	CGCATGATGAAGAACGACGGAATGCGATAAGTAATGAATGACGATTTTCGTGAA	240				
Query 260	TCATCGAATCTTTGAACGCAATTTGGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCGTTGA	319				
Sbjct 241	TCATCGAATCTTTGAACGCAATTTGGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCGTTGA	300				
Query 320	CGCTCATTTCTCTCTCAAAACCCCGGTTGGTATTGAGTGATCTCTAGTCGGACTAG	379				
Sbjct 301	CGCTCATTTCTCTCTCAAAACCCCGGTTGGTATTGAGTGATCTCTAGTCGGACTAG	360				
Query 380	CGCTTGGCTTGAAGATATTGGCATGGTACTGGATGCTGCTGACCTCTCAATG	439				
Sbjct 361	CGCTTGGCTTGAAGATATTGGCATGGTACTGGATGCTGCTGACCTCTCAATG	420				
Query 440	TATTAGTTTATCAAACTCTGTTGAATGGTGGCGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCG	499				
Sbjct 421	TATTAGTTTATCAAACTCTGTTGAATGGTGGCGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCG	480				
Query 500	GCTTACAACAACCAAGTTTGACCTCAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAA	559				
Sbjct 481	GCTTACAACAACCAAGTTTGACCTCAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAA	540				
Query 560	GCATATCAATAAGCGGAGGAGGATCATTACAGTATCTTTTG-CAGCGCTTAACTGCG	618				
Sbjct 541	GCATATCAATAAGCGGAGG--GGATC-TTA-AGTATTTCTTGGCAGCGCTTAACTGCG	596				
Query 619	GGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTATACAAACCTCTGGCTTTGGTTGGCT	678				
Sbjct 597	GGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTT-GATA-AGAACTCTTCTTGGTTGGC-T	653				
Query 679	AGAGATAGGTTGGCCAAAGGTTTACAAAACCAATTTAATTTTAC-GTTAGTCA	737				
Sbjct 654	AGAGAT-GGTTGGCG--AGGTTTACAAAACCAATTTAATTTTACAGTTAGTCA	710				
Query 738	AATTTTG-AATTAATCTTCAAACTTTCA 766					
Sbjct 711	AATTTTGAAATTAATCTTCAAACTTTCA 740					

Range 2: 1 to 375 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
374 bits(202)	6e-99	326/383(85%)	20/383(5%)	Plus/Plus			
Query 605	GCGCTTAACTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTATACAAACCTCTGG	664					
Sbjct 1	GCGCTT-AACTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTATACAGAACTCTTG	58					
Query 665	CTTTGGTTTGGCTAGAGATAGGTTGGCCAAAGGTTTACAAAAC-CAATTTAATTATT	723					
Sbjct 59	CTTTGGTTTGGCTAGAGATAGGTTGGCCAGAGGTTTAAACAAACCAATTTAATTATT	118					
Query 724	TTTACGTTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAA-CTTTC-ACAACGGAACCTCTGGTT	781					
Sbjct 119	TTTACGTTTAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTT	178					
Query 782	CTC-CATCCATAAAAAACCAGGAAATGCTATAAGGTAAAAATGAAATGCAATTTTCG	840					
Sbjct 179	CTCGCATGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAG-TAATATG-AATTGAGATTTTCG	236					
Query 841	-GAAACCTCAAACTTTTGAACGCA-ATTG-GCCCCGGGAATTCAGAGGAATGCCGT	897					
Sbjct 237	TGAATCATCGAATCTTTGAACGCAATTGCGCCCTCTGGTATTCAGAGGGCATGCCTGT	296					
Query 898	TTAAG-G-CTTTTCTCT-AA-CCCC-GGGTTTGGGTATTGAGGGGAAACCTCAGATC	952					
Sbjct 297	TTGAGGTCATTTCTCTCTCAAAACCCCGGTTTGG-TATTAGTG-ATACTCTTAG-TC	353					
Query 953	GGAAACAAGCCTTTTGGTTGAAAA 975						
Sbjct 354	GG-ACTAGGCGTTTGGTTGAAAA 375						

Range 3: 583 to 738 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
231 bits(125)	4e-56	152/163(93%)	10/163(6%)	Plus/Plus			
Query 20	GCGCTT-AACTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTATACAGAACTCTTG	78					
Sbjct 583	GCGCTTAACTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTATACAGAACTCTTG	641					
Query 79	TTTGGTTTGGCTAGAGATAGGTTGGCCAGAGGTTTAAACAAACCAATTTAATTATT	138					
Sbjct 642	TTTGGTTTGGC-TAGAGAT-GGTTGGC--GAGGTTTACAAAACAC-ATTTAATTATT	696					
Query 139	TTACAG-TTAGTCAAAATTTG-AATTAATCTTCAAACTTTCA 179						
Sbjct 697	TTACAGTTTAGTCAAAATTTGAAATTAATCTTCAAA-CTTTCA 738						

**Figura 21.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 11 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

>181109-030\_115\_61 ITS1.ab1 582

GTTGACGCCGGGTGCAGGCTGCTCCGGGCGCCCAACCTCCCACCCGTGA  
CTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCC  
GGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATA  
TAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGAT  
GAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  
ATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCA  
TGCCTGTCCGAGCGTCATTGTGCCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG  
TCGTCGTCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGCGCACCGTGT  
CCGGGCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTTAGGGCCGGC  
CGGGCGCCAGCCGACGTCCCAACATTTTTCTTCAGTTGACCTCGGATCA  
GGTAGGGATACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAAGAAAAAA  
GTCCCGGGAGCGGGTTGCTTGGGGGCTCATT

**Figura 22.** Resultados de la secuenciación por parte de Macrogen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 14. Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Fungal endophyte isolate 6551 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KR016475.1](#) Length: 607 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 543 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
957 bits(518)	0.0	531/537(99%)	1/537(0%)	Plus/Plus
Query 12	GTGCAGGCTGCCTCGGGGCGCCAACTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCG			71
Sbjct 8	GTGCAGGCTGCCTCGGGGCGCCAACTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCG			67
Query 72	GCGGGGAGCCCTCTCGGGGGGAGCGCGCGGGGACTACTGAACCTCATGCGTGAGAGTGA			131
Sbjct 68	GCGGGGAGCCCTCTCGGGGGGAGCGCGCGGGGACTACTGAACCTCATGCGTGAGAGTGA			127
Query 132	TGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCC			191
Sbjct 128	TGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCC			187
Query 192	GGCATCTGATGAAGAAGCAGAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAA			251
Sbjct 188	GGCATCTGATGAAGAAGCAGAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAA			247
Query 252	TTCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGCCGA			317
Sbjct 248	TTCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGCCGA			307
Query 312	CGCTCATTGCTGCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTGGGTGCTGTCCCCCGGGGGGAC			371
Sbjct 308	CGCTCATTGCTGCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTGGGTGCTGTCCCCCGGGGGGAC			367
Query 372	GGGCCCCGAAAGGACGCGCGGCACCGTGTCCGGGCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAAC			431
Sbjct 368	GGGCCCCGAAAGGACGCGCGGCACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAAC			427
Query 432	CGCTCGATTATGGGCGGGCGGGCGCCAGCGACGCTCCCAACATTTTCTTCAGGTTGAC			491
Sbjct 428	CGCTCGATTATGGGCGGGCGGGCGCCAGCGACGCTCCCAACATTTTCTTCAGGTTGAC			487
Query 492	CTCGGATAGGGATAGGACCTACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGAAAA			548
Sbjct 488	CTCGGATAGGGATAGGGAATACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGC-GGAGGAAAA			543

**Figura 23.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 14 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



```

>181109-030_C17_66_ITS1.ab1      1215
ATGATGGGGATGCAGTGCCTCCGGGCGCCCAACCTCCCACCCGTGACTA
CCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCCGGG
GACTACTGAATTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAA
AATCAGTCAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTGAATC
ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGC
CTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCG
TCGTCCCCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCG
GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTAAAGGGCCGGCCGG
GCGCCACCCAACCTTCCCAACCTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCATAAACCGGGAAGGAAATATTT
TTCGATGACCTCAAATCTAGTAAGACTACCCAGCAAACTTAAGCATATC
AATAAGCCGGAGGGAAAAACCTCTCGGGGGGCAAGCCCGGGGCACCACGG
AATTTTAGTCGAAAAAGTGGATGCAACTCGTATTCGAAATATAAAATCA
ATCAAAATTTTCAACAATGGAATTTTAGGCTTCGGGCTCTATATAAAT
AACTCAACGATAAGCCGCTACACTTAATGGTGAATTCAGAAATTCATT
GCAATCATCAAGATCTTTGAAAAGCCATTGCGGCACGGGTCACTTCGGG
GGGGGGCACGGCTGTTCAAAATTTTGTTCACCCCCGCCCGGGGG
TTTTTGGTGGTGGTTCCTCCCCCCCCCGGGGAGAAGAGCCCCAAAAAG
GAGAAGGTGGGAACCCGGTTTCGGGTCCCTCCCAAGATGAAGGGGGCT
TTTTTCCCCCCCCGATTAAATAGGGGGGGGGGGGGGGGCCCGGCCAAAA
ATTCCCTCCCCACCTTTTTTTTTTGGTGGGGGAACCCCCCAACAA
GGGGGGGGGGGACCCCGCCCCACCAATTTATAAAATTAATTTATTT
GGTCTGGGAAAGAAAAAAGAGAAAAAAAACATTAATAAATCCCAACAA
AAAGCCCCATAATC

```

**Figura 24.** Resultados de la secuenciación por parte de MacroGen. Base de cadena de nucleótidos del hongo 19.  
Fuente: Miguel Angel Castro Cornejo.

Ascomycota sp. isolate LTS627 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [MH430771.1](#) Length: 545 Number of Matches: 1

Range 1: 16 to 534 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Next Match</a> <a href="#">Previous Match</a>				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
918 bits(497)	0.0	513/520(99%)	3/520(0%)	Plus/Plus
Query 15	GCTGCCTCCGGGCGCCCAACCTCCACCCGCTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGG	74		
Sbjct 16	GCTGCCTCCGGGCGCCCAACCTCCACCCGCTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGG	75		
Query 75	AGCCCTCTCGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAACCTCATGCTGAGAGTGATGCAGT	134		
Sbjct 76	AGCCCTCTCGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAACCTCATGCTGAGAGTGATGCAGT	135		
Query 135	CTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC	194		
Sbjct 136	CTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC	195		
Query 195	GATGAAGAACGACGCAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTGAATCATCG	254		
Sbjct 196	GATGAAGAACGACGCAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTGAATCATCG	255		
Query 255	AGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCA	314		
Sbjct 256	AGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCA	315		
Query 315	TTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCCCCCGGGGGACGGGCC	374		
Sbjct 316	TTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCCCCCGGGGGACGGGCC	375		
Query 375	GAAAGGACGCGGCGCACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCG	434		
Sbjct 376	GAAAGGACGCGGCGCACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCG	435		
Query 435	ATTAAGGGCCGGCCGGGCGCCACCAACTTC-CCAACCTTTTCTTCAGGTTGACCTCGG	493		
Sbjct 436	ATT-AGGGCCGGCCGGGCGCCAGCGACGTCTCAACCTTTTCTTCAGGTTGACCTCGG	494		
Query 494	ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA-TAA	532		
Sbjct 495	ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA	534		

**Figura 25.** Resultados de la Secuenciación de la muestra del hongo 19 por parte del Blast con respecto a la mayor similitud encontrada. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

## Anexo 7. Viabilidad de las semillas



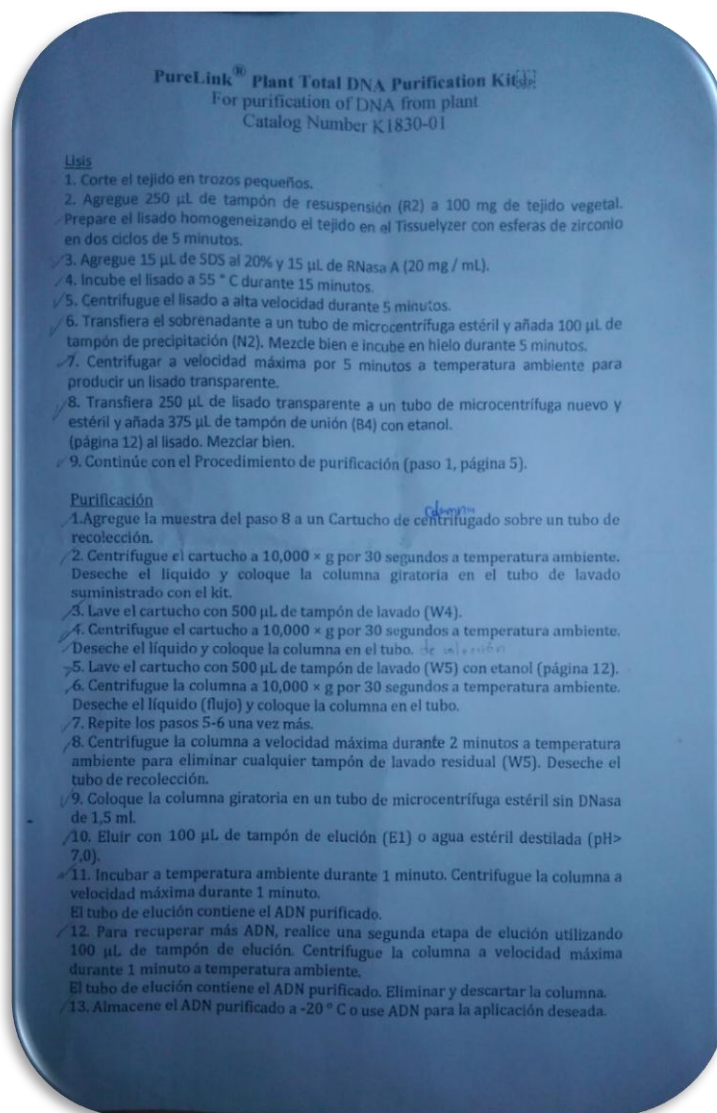
**Imagen 18.** Protocolo para la viabilidad de semillas de orquídeas. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Tabla 7.** Porcentaje de viabilidad de semillas.

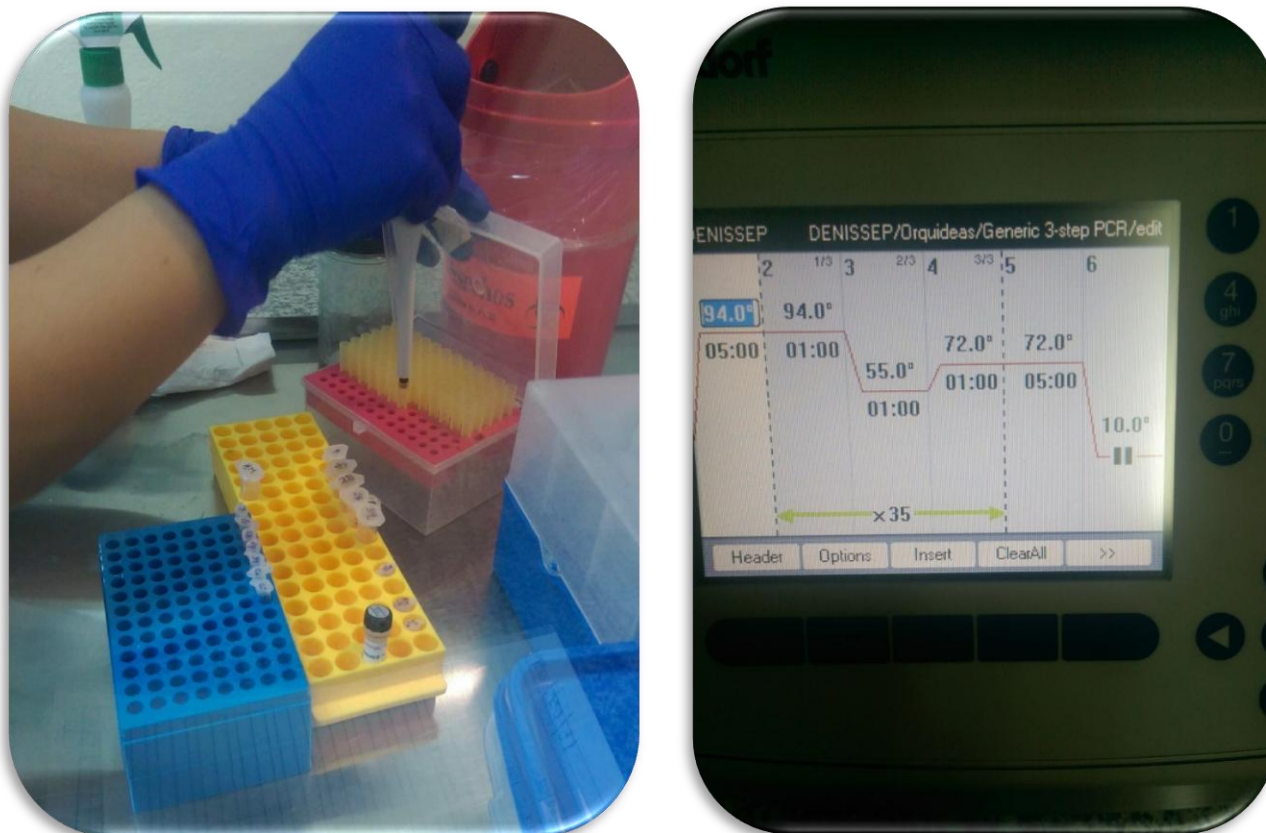
Especie	Viable	No viable	% viabilidad de semillas
<i>Elleanthus amethystiniodes</i>	85	15	85
<i>Cyrtorchillum Gyriterum</i>	92	8	92

Elaborado por : Miguel Ángel Castro Cornejo.

## Anexo 8. Extracción ADN raíces de orquídeas



**Imagen 19.** Protocolo de extracción de ADN meta genómica de las raíces de orquídeas. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Anexo 9. Proceso PCR de las muestras de raíces de orquídeas**

**Imagen 20.** Proceso PCR de las muestras de orquídeas. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



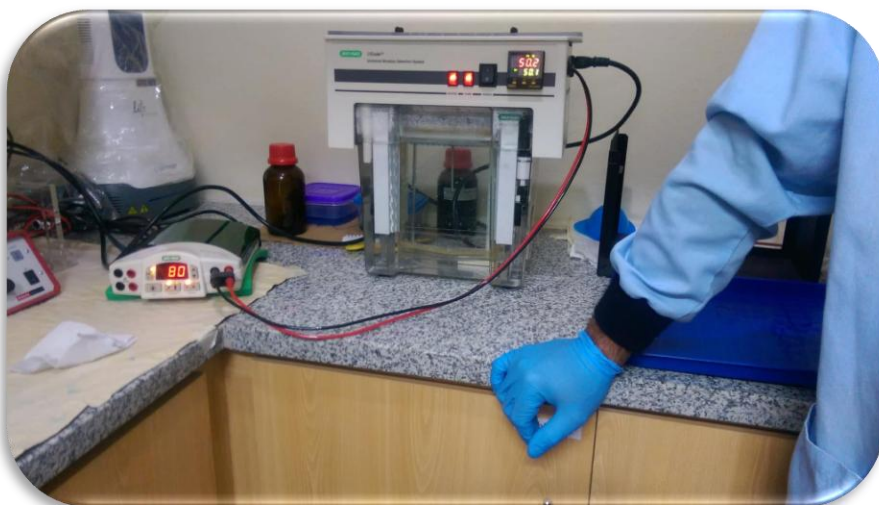
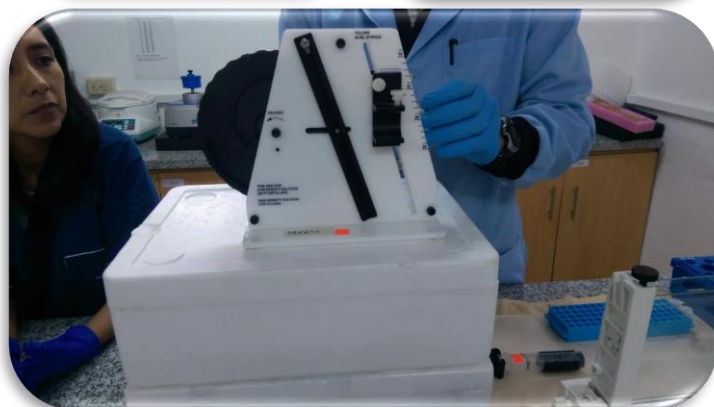
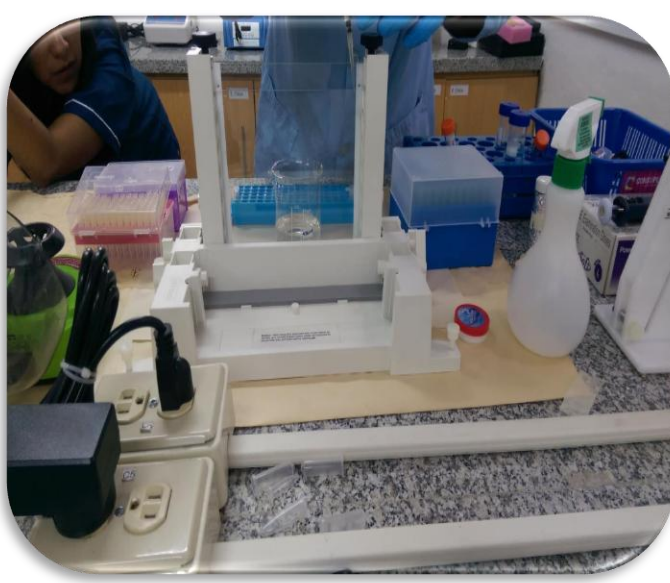
## Anexo 10. Proceso de migración de gel y electroforesis de las muestras de hongos y raíces



**Imagen 21.** Proceso de migración de gel y electroforesis de las muestras de hongos y raíces . Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.



### Anexo 11. Proceso DGGE de las muestras de raíces amplificadas





**Imagen 22.** Proceso DGGE de las muestras de raíces . Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

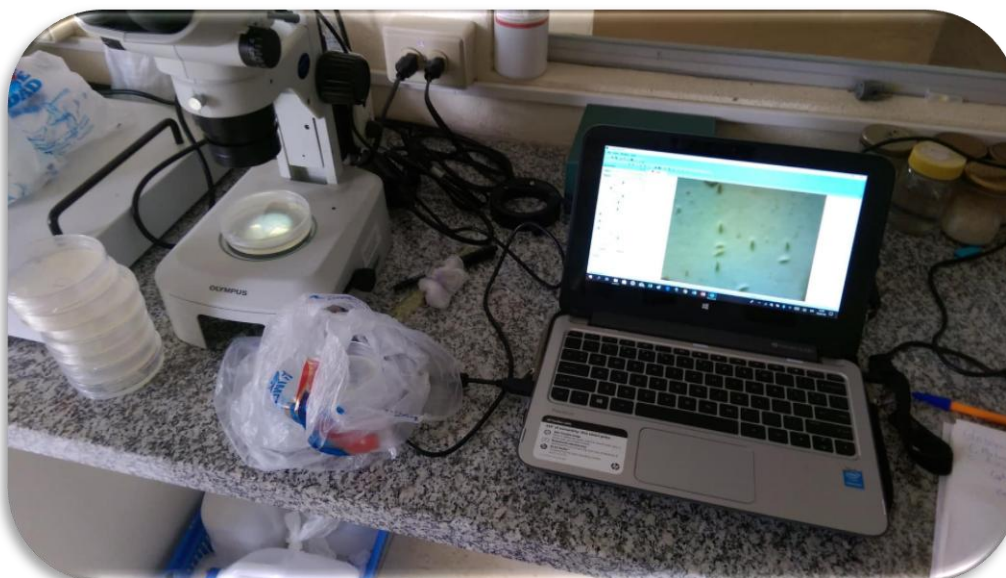


**Anexo 12. Proceso de germinación simbiótica de las semillas de orquídeas con sus respectivos hongos.**



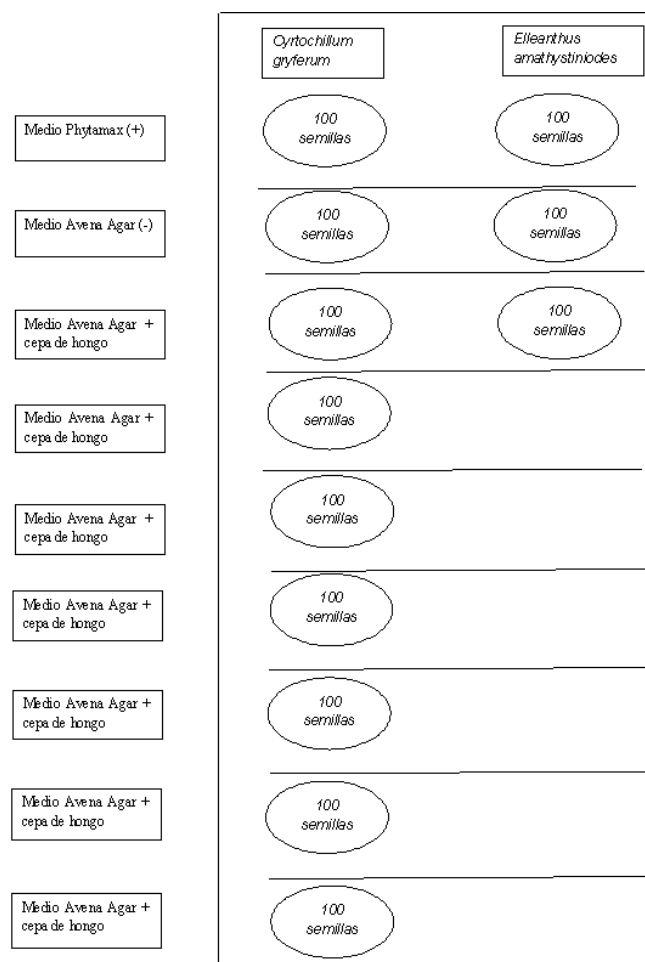
**Imagen 23.** Siembra de semillas de orquídeas con sus respectivos tratamientos. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.





**Imagen 24.** Análisis de los procesos germinativos cada 15 días después de su siembra. (Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Anexo 13.** Diagrama de trabajo en laboratorio para la inoculación de los hongos aislados con las semillas de ambas especies de orquídeas, con sus respectivos tratamientos en 10 repeticiones.



**Figura 26:** Diseño o esquema de laboratorio: Especies de semilla de orquídeas para cada tratamiento por repetición. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

## Anexo 14. Tablas Estadístico

**Tabla 8.** Resultados de la prueba Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ) para las variables no paramétricas de las semillas de *Elleanthus amethystiniodes* en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.

Variable	tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
SEMILLAS EN GRADOS	Avena	40	24.27	26.74	13.55	0.66	0.7065
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 19	40	23.30	25.84	18.78		
SEMILLAS EN GRADOS	Phytamax	40	25.24	22.61	24.73		

Variables no parametricas ( $p > 0.05$ ), variables no son significativamente diferentes.

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Tabla 9.** Resultados de análisis de varianza de la prueba de bondad de Test de tukey ( $p < 0.05$ ) comparación de medias para las variables no paramétricas de las semillas de *Elleanthus amethystiniodes* en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.

tratamiento	Medias	n	E.E.
Hongo 19	23.30	40	3.97 A
Avena	24.27	40	3.97 A
Phytamax	25.24	40	3.97 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Tabla 10.** Resultados de la prueba Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ) para las variables no paramétricas de las semillas de *Cyrtochillum Gyriferum* en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.

Variable	tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
SEMILLAS EN GRADOS	Avena	40	23.33	28.94	12.23	14.70	0.0202
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 1	40	22.50	38.83	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 10	40	22.50	39.15	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 11	40	22.50	37.00	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 14	40	22.50	39.47	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 3 (1)	40	22.50	39.47	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 3 (2)	40	22.60	37.67	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 8	40	22.50	39.15	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Hongo 9	40	22.50	38.83	0.00		
SEMILLAS EN GRADOS	Phytamax	40	25.66	21.56	18.43		

Variables no parametricas ( $p > 0.01$ ), variables no son significativamente diferentes. Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.

**Tabla 11. .** Resultados de análisis de varianza de la prueba de bondad de Test de tukey ( $p < 0.05$ ) comparación de medias para las variables no paramétricas de las semillas de *Cyrtochillum Gyriferum* en el tercer estadio germinativo con respecto al tratamiento utilizado en cada caja petri.

Trat.	Ranks
Hongo 3 (1)	186.13 A
Hongo 14	186.13 A
Hongo 8	188.43 A
Hongo 10	188.43 A
Hongo 9	190.73 A
Hongo 1	190.73 A
Hongo 3 (2)	196.58 A
Hongo 11	198.06 A
Avena	218.81 A B
Phytamax	261.00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Fuente: Miguel Ángel Castro Cornejo.